

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В.К.АНТОНОВ

ХИМИЯ ПРОТЕОЛИЗА



СПб. ГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК

Ордена Трудового Красного Знамени
институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина

В.К.АНТОНОВ

ХИМИЯ ПРОТЕОЛИЗА

2-Е ИЗДАНИЕ, ИСПРАВЛЕННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ



Химия протеолиза/ В.К.Антонов. - М.: Наука, 1991. - 504 с. -
ISBN 5-02-004111-4

В книге суммирован обширный фактический материал по химии протеолитических и других ферментов, катализирующих гидролиз амидных связей. Рассматриваются структура субстратов и ферментов, механизмы неферментативного гидролиза производных карбоновых кислот, специфичность и эффективность катализа амидгидролазами проблемы регуляции ферментативной активности. Значительное внимание уделено подробному разбору механизмов каталитического действия протеолитических ферментов. На основе собственных и литературных данных автор формулирует представления о причинах эффективности и специфичности ферментов рассматриваемого класса.

Книга дополнена новыми сведениями, появившимися со времени выхода 1-го издания.

Рассчитана на научных сотрудников, преподавателей, аспирантов и студентов, работающих в области ферментативного катализа и в смежных областях.

Табл. 82. Ил. 134. Библиогр. 3438 назв.

Chemistry of proteolysis/ V.K.Antonov.- Moscow: Nauka, 1991. - 504

The book provides a comprehensive coverage of the chemistry of proteolytic and other enzymes catalyzing hydrolysis of amide bonds. It discusses the structures of substrates and enzymes, mechanisms of nonenzymatic hydrolysis of carboxylic acid derivatives, and problems of regulation of enzymatic activity. Much attention is paid to thorough analysis of mechanisms of the catalytic action of proteolytic enzymes. Literature data and those obtained by the author underlie the concepts on the nature of efficiency and specificity of the enzymes of this class. The book contains up-to-date information appeared after the first edition.

Ответственный редактор

член-корреспондент АН СССР Р.М.Хомутов

Рецензенты: доктора химических наук В.М.Липкин, М.Я.Карпейский

Редактор издательства О.Л.Оболонская

Первое издание этой книги, вышедшее в 1983 г., очень быстро разошлось, что убедило меня в актуальности рассмотренных в ней проблем. За прошедшие с тех пор восемь лет интерес к этим проблемам не только не снизился, но получил новый импульс в связи с успехами генной инженерии, позволившими существенно облегчить структурные и структурно-функциональные исследования ферментов, в том числе и амидгидролаз. Вместе с тем мы по-прежнему не можем дать однозначного ответа на вопрос о причинах уникальных свойств биологических катализаторов, несмотря на то, что фактические данные о них растут лавинообразно.

Все это побудило меня предпринять второе издание этой книги, дополнив ее появившимися за эти годы новыми сведениями. Структура книги осталась прежней, хотя были введены некоторые новые разделы, в частности, о методах направленного мутагенеза амидгидролаз и др. Я старался сохранить возможность использования книги как справочного издания. В связи с этим значительно увеличился перечень ферментов, а библиография, доведенная до 1990 г., возросла почти в полтора раза.

В подготовке второго издания большую помощь мне оказали С.Л.Александров, А.Ю.Америк, Ю.В.Капитанников, Н.Е.Кудряцева, Е.В.Шимбаревич и другие сотрудники моей лаборатории, которым я приношу свою глубокую благодарность.

Каждый, кто задумывается о том, как функционируют биологические катализаторы — ферменты, какие механизмы лежат в основе поистине огромных ускорений при ферментативном катализе, как осуществляется выбор превращаемого вещества среди множества сходных соединений, обращается к сведениям, полученным при изучении протеолитических ферментов, т. е. ферментов, катализирующих гидролиз амидных связей. Это обусловлено, во-первых, тем, что протеолитические ферменты относятся сегодня к числу наиболее изученных, во-вторых, очень много известно о механизмах гидролиза амидов и других производных карбоновых кислот в модельных системах. Протеолитические ферменты не содержат сколько-нибудь сложных кофакторов или коферментов, так что катализ белковой молекулой предстает здесь в наиболее "чистом" виде.

Не следует, однако, думать, что протеолиз интересен лишь как наиболее изученный пример ферментативного катализа. Биологическая важность этого процесса долгое время недооценивалась, и лишь только в последние годы стало ясно, что протеолиз играет решающую роль в регуляции большинства физиологических процессов, происходящих в организме. Пожалуй, именно этот аспект изучения протеолиза превалирует в публикациях последних лет.

В этой книге проблемам биологических функций протеолитических ферментов уделено минимальное внимание. Основная ее цель — дать систематическое изложение химических явлений, происходящих при катализируемом ферментами гидролизе амидов. Такое рассмотрение подразумевает знание структуры реагирующих веществ, основных закономерностей гомогенного катализа и важнейших сведений о специфичности, эффективности и регуляции ферментативного катализа. Все эти вопросы в той или иной мере отражены в этой книге, причем я стремился привести максимум экспериментальных данных с тем, чтобы работающие в этой области могли найти в ней необходимый справочный материал. Литература, посвященная химическим аспектам протеолиза, огромна. Поэтому выбор литературных источников оказывается в значительной мере субъективным. Все же я надеюсь, что читатель найдет здесь наиболее важные публикации по рассматриваемым проблемам, в том числе многие из последних обзоров. Естественно, что я не мог обойти данные, иллюстрирующие мою собственную точку зрения на процесс ферментативного гидролиза производных карбоновых кислот. Эта точка зрения, которая, по-видимому, во многом совпадает с представлениями других исследователей, сформировалась в ходе экспериментов, ставившихся в лаборатории химии ферментов Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина АН СССР. Эти работы проводились мною совместно с Л.М.Гинодманом, Л.В.Козловым,

Л.Д.Румшем, С.Л.Александровым, Л.Я.Бессмертной, Т.И.Воротынцевой, А.Г.Гуровой, В.Л.Дьяковым, Е.Д.Дьяченко, А.М.Желковским, А.А.Зинченко, Ю.В.Капитанниковым, Ю.И.Крыловой, А.Г.Михайловой, Т.В.Ротановой и другими, без вклада которых написание этой книги было бы невозможным. Очень большую роль в формировании моих представлений о ферментативном катализе сыграли беседы и споры с М.Я.Карпейским, Г.И.Яковлевым, Е.М.Поповым, Г.И.Лихтенштейном, Д.С.Чернавским, Ю.И.Хургиным, которым, пользуясь случаем, приношу свою глубокую благодарность. Я очень признателен Л.М.Гинодману, Е.М.Попову, К.Мартинеку и Л.И.Кришталю, прочитавшим отдельные разделы этой книги и давшим ценные критические замечания. Большую помощь в подготовке рукописи оказали Т.Н.Баршевская, Н.А.Гаврилова, Л.Л.Завада и А.А.Мишин, которым я искренне благодарен. Я буду глубоко признателен за все замечания и критические высказывания по поводу этой книги.

Протеолиз – ферментативный гидролиз амидных связей в белках и пептидах – один из универсальнейших и важнейших химических процессов живой природы. Нет такого организма, где эти процессы не происходили бы с той или иной степенью интенсивности. Необходимость постоянного обновления белкового материала клетки без существенных затрат энергии на создание первичных "строительных блоков" – аминокислот, с одной стороны, и значительная химическая устойчивость амидной связи – с другой, поставили перед эволюцией трудную задачу создания механизма быстрого и селективного расщепления белков. Эта задача, вероятно, была решена на очень ранних этапах развития живого. Возникли протеолитические ферменты – удивительные биологические катализаторы, в миллиарды и десятки миллиардов раз ускоряющие реакцию гидролиза белков.

Долгое время функции протеолитических ферментов связывали исключительно с их ролью в деструктивных, катаболических процессах. Действительно, эта функция имеет первостепенное значение. Период полураспада белков в клетке изменяется в широких пределах. Например, орнитиндекарбоксилаза в печени крыс имеет период полураспада 11 мин, РНК-полимераза из того же источника – 1,3 ч, миозин скелетных мышц кролика – около 30 дней, а гемоглобин, если и распадается, то крайне медленно [1,2]. Как регулируются в организме все эти процессы, как они синхронизируются? Ответ на эти вопросы – важнейшая задача биохимии.

Однако роль протеолитических ферментов не ограничивается процессами деструкции. Все больший интерес привлекают к себе регуляторные функции этих ферментов [3-6]. Характерной особенностью регуляторных функций протеаз является однонаправленность и необратимость их действия. Это особый тип регуляции, отличающийся от всех других типов биологического контроля в организме. Трудно перечислить все регуляторные процессы, осуществляемые с помощью протеолитических ферментов. Наиболее изученные из них относятся к так называемым реакциям ограниченного протеолиза. Ограниченный протеолиз – важнейший этап биосинтеза белка. Посттрансляционное расщепление предшественников биологически активных белков ("процессинг") является, по-видимому, непременным этапом белкового синтеза. Огромное значение имеют реакции протеолиза в образовании полипептидных гормонов. Во многих случаях протеазы выполняют роль "спусковых механизмов", триггеров ряда каскадных процессов. Наиболее известный пример такого рода – система свертывания крови. При этом ферменты выполняют функции не только сигнала к запуску такого процесса, но и усили-

телей этого сигнала, а также участвуют в сопряжении одних физиологических процессов с другими.

Как же протеолитические ферменты выполняют свои функции? Этот вопрос уже давно занимает исследователей [7]. Впервые идея о химической природе биологического катализа была сформулирована еще в 30-х годах прошлого века И.Я.Берцелиусом. Однако лишь в начале нынешнего столетия к этим вопросам стали подходить с количественной мерой. Огромное значение для развития химии ферментов и химии белка имели работы Э.Фишера. Примерно через сто лет после работ Берцелиуса удалось получить ферменты в кристаллическом виде, и среди них были протеолитические ферменты.

Эпоха, предшествовавшая появлению первых рентгеноструктурных исследований ферментов, характеризовалась все большим проникновением в эту область идей и методов физики и химии. В этом отношении серьезной вехой, по моему мнению, был обзор М.Бендера (1960 г.) "Механизмы катализа нуклеофильных реакций производных карбоновых кислот" [8], где, пожалуй, впервые было четко показано, что механизм каталитического действия ферментов может быть понят на основе общих химических закономерностей гомогенного катализа при учете специфических особенностей макромолекулярной структуры белка. Последующее развитие химической энзимологии и физической органической химии полностью подтвердило этот вывод.

Поражает огромное число и разнообразие протеолитических ферментов. Удивительно, что для катализа одной и той же реакции — реакции гидролиза амидной связи — природа создала множество различных биокатализаторов. Внимательный анализ показывает, однако, что собственно химические механизмы всех изученных в этом отношении протеаз можно свести к двум весьма сходным типам: нуклеофильному (ковалентному) катализу, осуществляемому группировками самой молекулы фермента, и общему основному катализу расщепления амидной группы под действием связанной с ферментом молекулы воды. Различие здесь не очень существенное: в первом случае нуклеофилом является группа белка, во втором — молекула воды. Более того, второй тип катализа осуществляется и в первом случае на более поздних стадиях процесса (деацилирование).

Таким образом, можно думать, что химический механизм протеолиза в целом очень сходен для всех или большинства протеолитических ферментов. Этот же механизм, по-видимому, используется и другими ферментами, расщепляющими производные карбоновых кислот (эстеразы, амидазы и т.п.). Существуют ли принципиально отличные от известных в настоящее время механизмы гидролиза амидов? На этот вопрос нельзя пока ответить однозначно, однако я думаю, что такая возможность маловероятна.

В чем же причина разнообразия протеаз? Во-первых, она, очевидно, связана с различием в специфичности, которая, с одной стороны, определяется структурой связывающего субстрат участка молекулы белка и, с другой — способностью белковой молекулы использовать энергию связывания субстрата для ускорения его химического превращения. В.Дженкс [9] остроумно сформулировал эту особенность ферментов как "эффект Цирцеи" — способность фермента "завлекать" и превращать субстрат. Во-вторых, причина разнообразия протеаз заключается в разных условиях их функционирования как в отношении pH, температуры, состава среды, так и в различии их локализации в клеточных органеллах, цитоплазме, мембранах или биологических жидкостях.

Протеолитические ферменты являются во многих отношениях пробным камнем химической энзимологии. В первую очередь на этом классе ферментов проверяются многочисленные методические приемы исследований и теоретические концепции. Вместе с тем закономерности, обнаруженные для этих объектов, по-видимому, имеют общее значение и справедливы для многих других типов биокатализаторов. Это оправдывает подробное рассмотрение полученных в последние годы данных о структуре, свойствах и механизме действия именно этой группы ферментов, тем более что такого систематического обзора протеаз в химическом аспекте до сих пор не делалось. Мне кажется целесообразным, рассматривая протеазы, привлекать сюда при необходимости и другие ферменты, расщепляющие амидные связи. Для всех ферментов этого типа необходимо общее название. В этой книге все ферменты, катализирующие гидролиз амидов, обозначены термином "амидгидролазы".

Порядок изложения материала в книге, насколько это возможно, воспроизводит последовательные этапы самого каталитического акта. Сначала рассматриваются реагенты — субстраты и ферменты, их структура и свойства. Ферменты распределены по четырем известным в настоящее время группам, отличающимся структурой каталитического аппарата. Такая классификация основана главным образом на отношении ферментов к специфическим для данной группы ингибиторам. Конечно, для многих амидгидролаз их отнесение к той или иной группе не может считаться окончательным до тех пор, пока не будут получены соответствующие данные о строении активного центра. Сам список ферментов вряд ли можно считать полным, поскольку почти в каждом номере ведущих биохимических журналов появляются сообщения о выделении новых амидгидролаз.

Описание механизмов действия ферментов нельзя проводить, не опираясь на данные о механизмах гидролиза производных карбоновых кислот в присутствии небιологических катализаторов и без знания основных закономерностей гомогенного катализа. Этим вопросам посвящена отдельная глава.

Фактический материал по каталитическим свойствам амидгидролаз (кинетика, специфичность, pH-зависимость и т.п.) собран в двух последующих главах. Эти данные вместе с результатами кристаллографических исследований являются основой для понимания собственно каталитического акта. Здесь целесообразно сначала проанализировать структуру фермент-субстратных комплексов и лишь затем — собственно акт химического расщепления связи. Первый этап такого анализа в настоящее время основывается на сравнительно немногочисленных данных рентгеноструктурного исследования комплексов ферментов с ингибиторами или очень медленно расщепляемыми субстратами (квазисубстратами). Экстраполяция этих данных на истинные фермент-субстратные комплексы требует известной осторожности, однако без этого любые выводы о механизме реакции будут не более чем гипотезами.

Имеющиеся сегодня данные показывают, что элементарный акт химического изменения амидной группы на ферменте происходит, по крайней мере, с наиболее адекватными субстратами, практически спонтанно, с очень низкими активационными барьерами. Это приводит к мысли о том, что все события, приводящие к эффективному катализу амидгидролазами, разыгрываются на стадиях предшествующих образованию переходного состояния. Читатель заметит, что в этой книге автор сравнительно редко анализирует "структуру" переходных состояний. Я убежден, что особенно в ферментативном катализе такой анализ дает значи-

тельно меньше сведений, чем анализ структуры основного состояния реагирующей системы, который может базироваться на четких экспериментальных фактах. Это убеждение привело автора и его коллег к формулированию концепции ферментативного катализа, изложенной в последних разделах этой книги.

Итак, цель этой книги - попытаться по возможности с единых позиций рассмотреть химические аспекты ферментативного гидролиза амидной связи, выявить то общее и то особенное, что позволяет выделить амидгидролазы в самостоятельную и очень важную группу ферментов, и, наконец, еще раз попытаться ответить на вопрос о причинах уникальной эффективности и специфичности ферментов.

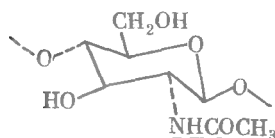
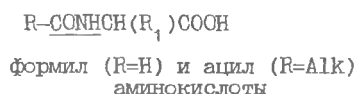
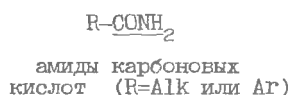
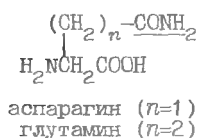
1.1. Общая характеристика

Вещества, химическое превращение которых ускоряется под действием ферментов, называются субстратами этих ферментов. В этой книге будут рассмотрены процессы ферментативного гидролиза амидных связей в составе самых разных субстратов.

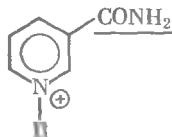
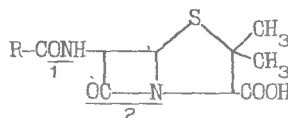
Подавляющее большинство субстратов протеаз представляет собой белки или пептиды. Здесь амидная, или, как еще ее называют, пептидная, связь образует структуру, связывающую отдельные остатки аминокислот:



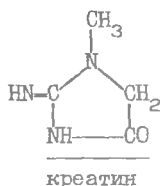
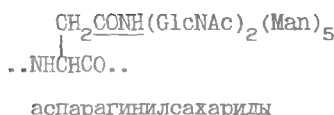
Гидролизуемая амидная связь может находиться в середине цепи, и в этом случае ее расщепление катализируется эндопептидазами, или же на N- или C-конце полипептидной цепи, и в этом случае она является объектом действия экзопептидаз. Свойства самой амидной группы мало зависят от ее положения в полипептидной цепи. Известно большое число ферментов¹, катализирующих гидролиз иных, чем пептидные, амидных связей [10]. Некоторые типы таких связей приведены ниже:



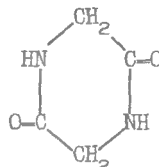
N-ацетилглюкозамин

никотинамид и его
производные

пенициллины



креатин



2,5-диоксопиперазин

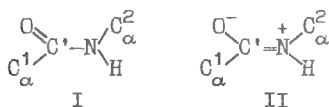
¹ См. табл. 12 (КФ 3.5.1 и 3.5.2)

Таким образом, расщепляемая амидная группа может входить в самые разные, как линейные, так и циклические, структуры, встречающиеся среди природных соединений. Кроме этого, многие протеолитические ферменты катализируют гидролиз амидных и других связей в производных карбоновых кислот, не являющихся их природными субстратами. Например, такие протеазы, как α -химотрипсин, папаин и др., эффективно катализируют гидролиз амидов, анилидов и эфиров N-ациламинокислот.

Если говорить о пептиднбелковых субстратах протеолитических ферментов, то их структурные особенности целесообразно проанализировать в несколько этапов, рассмотрев сначала собственно расщепляемую амидную (пептидную) группу, затем аминокислотный остаток изолированно и в составе короткого олигопептида и, наконец, белковую молекулу в целом.

1.2. Амидная группа

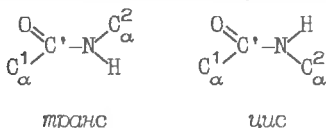
Амидную группу можно формально рассматривать как объединяющую в единой структуре альдегидную (кетонную) и аминную группировки. Однако такое представление неверно, так как свойства амидной группы далеко не являются аддитивной комбинацией свойств, входящих в нее группировок (см.: обзоры [11-13]). Это обусловлено главным образом взаимодействием неподеленной пары электронов азота с π -электронами двойной углерод-кислородной связи. Вследствие этого амидную группу можно рассматривать как структуру, возникающую при суперпозиции двух резонансных форм: нейтральной (I) и цвитерионной (II), причем доли этих форм составляют соответственно 0,6 и 0,4 [14].



Такое представление хорошо объясняет многие свойства амидной группы, однако не является в настоящее время полным.

1.2.1. Геометрия

Представление о взаимодействии неподеленной пары электронов N-атома с π -электронами двойной связи C=O в амидах приводит к ряду следствий: а) длина связи C-N в амидах должна быть меньше, чем в аминах, а длина связи C=O — больше, чем в кетонах; б) атомы O, C, N и H амидной группы должны лежать в одной плоскости; в) амидная группа может существовать в *цис*- и *транс*-конформациях, разделенных значительным активационным барьером:



Посмотрим, как выполняются эти следствия в реальных молекулах. Однако прежде необходимо сказать несколько слов о номенклатуре, используемой при описании геометрии амидной группы.

Структура амидной группы может быть описана пятью длинами связей:

$r_{C_\alpha-C}, r_{C-O}, r_{C-N}, r_{N-C_\alpha}$ и r_{N-H} (из которых наиболее важными для ее характеристики являются длины связей C-O и C-N) и шестью валентными углами: $C_\alpha C'O, C_\alpha C'N, OC'N, C'NC_\alpha, C_\alpha NH$ и $C'NH$. По рекомендации Международной комиссии по номенклатуре [15] валентные углы обозначаются буквой τ с соответствующими индексами, т.е. $\tau_{C_\alpha C'O}$ и т.д.

В плоской амидной группе первые три угла связаны отношением

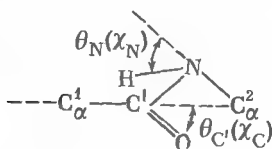
$$\tau_{C_\alpha C'O} + \tau_{C_\alpha C'N} + \tau_{OC'N} = 360^\circ.$$

То же справедливо и для вторых трех углов. Кроме того, используются значения двугранных (торсионных) углов:

$$\omega_1 = \omega_{C_1 C' N C_2}, \quad \omega_3 = \omega_{OC' N C_2},$$

$$\omega_2 = \omega_{OC' N H}, \quad \omega_4 = \omega_{C_1 C' N H}.$$

Для *цис*-амидов $\omega_1 = \omega_2 = 0^\circ$ и $\omega_3 = \omega_4 = 180^\circ$, а для *транс*-амидов $\omega_1 = \omega_2 = 180^\circ$ и $\omega_3 = \omega_4 = 0^\circ$. Торсионные углы в амидной группе связаны между собой отношением $(\omega_1 + \omega_2) - (\omega_3 + \omega_4) = 0$. В большинстве работ пользуются лишь одним углом ω_1 , обозначая его как ω . В некоторых работах используют двугранные углы, обозначаемые как θ_C , и θ_N [16] или как χ_C и χ_N [17], значение которых ясно из схемы:



Эти углы характеризуют отклонения амидной группы от плоского строения и связаны с углами ω следующими зависимостями:

$$\theta_C (\chi_C) = \omega_1 - \omega_3 + \pi = -\omega_2 + \omega_4 + \pi,$$

$$\theta_N (\chi_N) = \omega_2 - \omega_3 + \pi = -\omega_1 + \omega_4 + \pi.$$

Наконец, угол между биссектрисами θ_C , и θ_N иногда [17] обозначают как τ , причем

$$\omega_1 = \tau + 0,5(\theta_C, -\theta_N),$$

$$\omega_2 = \tau - 0,5(\theta_C, -\theta_N) \text{ и т.д.}$$

Межатомные расстояния в амидах могут быть получены или из данных кристаллографического, в том числе и нейтронного анализа [12, 18, 19], или методом микроволновой спектроскопии [20, 21]. В последнем случае можно получить геометрические параметры молекулы в изолированном (газовом) состоянии.

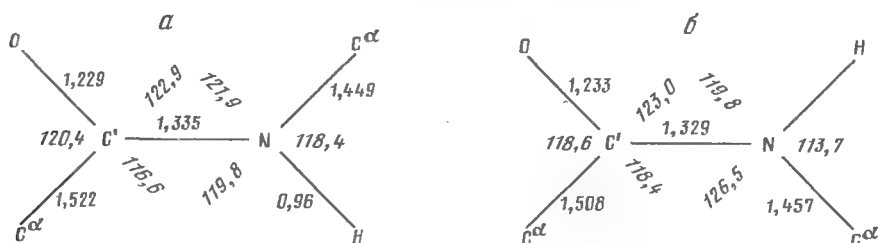
Данные табл.1 показывают, что, как и следовало ожидать на основании резонансной модели амидной группы, C-N-связь в амидах значительно короче, чем в аминах. Однако для индивидуальных молекул амидов (в газовой фазе) длина связи C=O не отличается от таковой в ацетоне. Уже эти факты показывают недостаточность представлений о суперпозиции резонансных структур (I) и (II) для описания амидной группы.

В конденсированном состоянии длина связи C=O увеличивается. Результаты

Таблица 1. Межатомные расстояния и углы в амидах, метиламине и ацетоне

Вещество и его состояние	$r_{C-N^{\circ}A}$	$r_{C=O^{\circ}A}$	Угол $NC^{\circ}O$, град.	Угол $NC^{\circ}H(C)$, град.	Угол $OC^{\circ}H(C)$, град.	Литера- турный источник
$HOCONH_2$						
Газ	1,376	1,19	123,8	113,24	122,96	[20]
"	1,352	1,219	124,7	112,7	122,6	[21]
Кристаллы	1,300	1,255	121,5	—	—	[22]
CH_3CONH_2						
Газ	1,36	1,21	125	—	122	[23]
Кристаллы	1,38	1,28	122	109	129	[24]
CH_3-NH_2	1,47	—	—	—	—	[25]
$(CH_3)_2C=O$	—	1,21	—	—	—	[26]

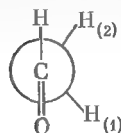
многочисленных кристаллографических исследований производных аминокислот и пептидов [18], а также белков [27] приводят к средним значениям длин связей и валентных углов амидной группы, показанных на рис. 1.

Рис. 1. Длина связей и валентные углы в *транс*- (а) и *цис*- (б) пептидной группе [18]

Следует отметить, что эти параметры варьируют в зависимости от конформации аминокислотного остатка [28]. Так, длина $C'-N$ -связи может изменяться от 1,343 до 1,371 Å. Таким образом, в конденсированном состоянии амидов их геометрия согласуется с изложенными выше представлениями, однако для описания амидной группы в отсутствие межмолекулярных взаимодействий эти представления нуждаются в уточнении.

Соблюдается ли второе следствие из представлений об амидной связи как резонансном гибриде нейтральной и ионной форм, т.е. является ли амидная связь плоской?

Исследования микроволновых спектров формамида привели в 1960 г. [20] к заключению, что в этом соединении атом азота заметно выведен из плоскости, образуемой атомами C', N_1 и N_2 :



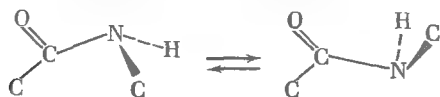
двугранные углы $\text{HCNH}_{(2)}$ и $\text{OSNH}_{(1)}$ составляют соответственно $12 \pm 5^\circ$ и $7 \pm 5^\circ$. Эти данные, однако, не согласуются с данными других исследователей [21,29].

Проблема отклонения структуры амидной группы от плоской была исследована теоретически и экспериментально в большом числе работ [16,17,19,28,30-42]. Результатом этих исследований явилось обнаружение того факта, что во многих циклических [17,30,34,43] и линейных [32,33,35,40] амидах и пептидах наблюдается заметное отклонение от плоской структуры – атомы N и C' могут выходить из плоскости соответственно $\text{C}_\alpha^1\text{ON-}$ и $\text{C}'\text{C}_\alpha^2\text{N-}$ атомов (табл.2). Анализ рентгеноструктурных данных, полученных с высоким разрешением, также показывает наличие ряда неплоских амидных связей в некоторых белках [27,44]. Наи-

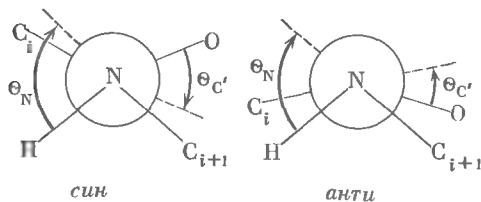
Таблица 2. Отклонения от плоской структуры амидной группы

Соединение	$\Delta\omega$, град.	θ_N , град.	θ_C , град.	Литературный источник
Glu-Leu	-11,4	+24,1	+0,2	[33]
Gly-Gly	+3,6	+8,2	+3,3	[33]
Gly-Ala(HCl)	-10,7	+17,2	+4,5	[33]
Ala-Ala	+0,8	-21,1	-2,7	[33]
Ac-D-Ala-D-Ala	-12,0	+19,0	+3,0	[39]
AcPhe-Tyr	-17,7	+11,4	+6,2	[35]

большим искажениям подвергаются связи у атома азота (угол θ_N) и в меньшей степени – карбонильного атома углерода (угол θ_C). Пирамидализация атома азота в амидах приводит к возможности двух устойчивых состояний, т.е. к возможности инверсии конфигурации:



Барьер такой инверсии составляет в формамиде около 1,1 ккал/моль [20]. Аналогично пираидализация карбонильного углерода может приводить к двум конформациям: *син*- ($\theta_N \cdot \theta_C < 0$) и *анти*- ($\theta_N \cdot \theta_C > 0$) [40]:



Направление и величина пираидализации зависят от электронных свойств соседней σ -связи [40]. Существует линейная корреляция ($R=0,893$) между длинами $\text{C}'\text{-N-}$ связи и степенью пираидализации атома азота (θ_N) [42].

Теоретические расчеты энергетике внеплоскостной деформации амидной группы [16,34,35,38] показывают, что минимальные значения энергии лежат в области $\Delta\omega=10^\circ$ и $\theta_N=-20^\circ$ (рис. 2,а). Отклонения от плоской амидной связи до

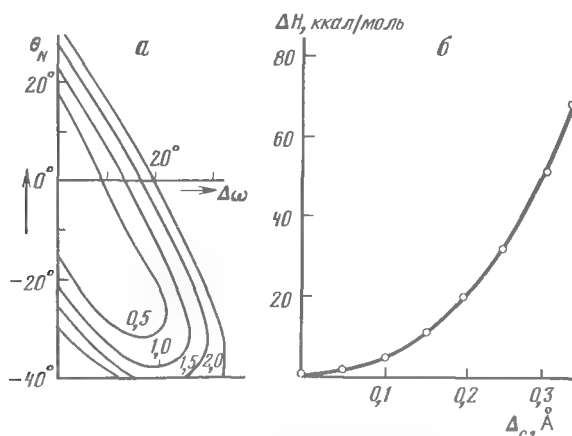
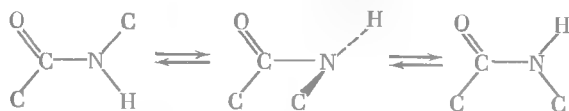


Рис. 2. Внеплоскостная деформация амидной группы
 а – изоэнергетические контуры внеплоскостной деформации амидной группы в ацетамиде в зависимости от величины углов θ_N и $\Delta\omega$ ($\Delta\omega = 180 - \omega$) [рассчитано методом INDO]; б – изменение энергии при синхронной гибридизации С- и N-атомов (рассчитано методом CNDO/2, программа GEOMO)

величин $\Delta\omega \approx 20^\circ$ требуют энергетических затрат, не превышающих 2–3 ккал/моль [35].

Из рис 2, б видно, что внеплоскостная деформация С'-атома, соответствующая выходу этого атома из плоскости С_α-, N- и O-атомов на 0,1 Å, требует затраты энергии около 5 ккал/моль. Однако дальнейшая деформация связана со значительными энергетическими потерями.

Итак, амидная группа может заметно отличаться от плоской за счет изменений двугранного угла (ω) и выхода из плоскости атомов С' и N, т.е. изменений углов θ_N и $\theta_{C'}$. Такие изменения не требуют существенных затрат энергии. По-видимому, энергетическая диаграмма амидной группы представляет собой достаточно широкую "долину" вблизи значений θ_N и $\theta_{C'}$, равных нулю, и значений $\omega = 0^\circ$ и 180° , такую, что заметные отклонения от этих значений практически не изменяют энергии системы. Однако большие изменения значений ω , в частности переход от *транс*-формы ($\omega = 180^\circ$) к *цис*-форме ($\omega = 0^\circ$), требуют значительной энергии, так как такой переход сопровождается потерей энергии резонансной стабилизации в переходном состоянии.



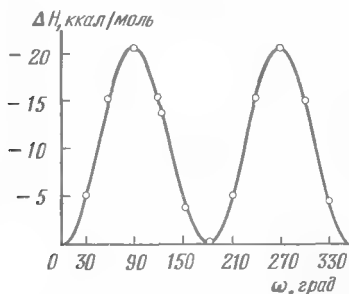
Теоретическое [14, 50] и термохимическое [51] определение энергии резонанса в амидной связи дает величину около 21–23 ккал/моль. Как видно из данных, приведенных в табл. 3, эта величина близка к величине изменения свободной энергии *цис-транс*-перехода [50–52].

Вообще говоря, многочисленные данные по барьерам *цис-транс*-переходов в амидах довольно противоречивы [12]. Вместе с тем для некоторых серий амидов удается связать величины свободной энергии вращения ($\Delta G^\ddagger$) с такими параметрами заместителей, как стерические постоянные σ и электронные (δ) и

Таблица 3. Активационные параметры *цис-транс*-перехода в некоторых амидах

Соединение	$\Delta G^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$, э.е.	Литературный источник
HOCNH_2	17,7	18,5	+2,7	[45]
$\text{HOCN}(\text{CH}_3)_2$	19,5	18,5	-5,1	[46]
$\text{CH}_3\text{CON}(\text{CH}_3)_2$	17,65	10,6	-23,5	[47]
$\text{CF}_3\text{CON}(\text{CH}_3)_2$	17,7	9,3	-28,0	[47]
$(\text{CH}_3)_3\text{CCON}(\text{CH}_3)_2$	10,5	13,5	+10,0	[48]
$\text{HOCN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	21,6	19,5	-6,5	[49]

σ^*) и резонансные (σ_R) постоянные в виде уравнений линейной зависимости свободных энергий [48,53]. Наибольший вклад в изменение барьера вращения вносят стерические параметры заместителей [53]. Барьер вращения вокруг связи C-N увеличивается с увеличением полярности растворителя [54]. Квантово-химическими методами была рассчитана [55] кривая изменения энергии при *цис-транс*-переходе в формамиде (рис.3). В этих расчетах учитывалась неплоская структура формамида [20] так, что изменение угла ω характеризовало переход от неплоской *цис*- к неплоской *транс*-связи.

Рис.3. Потенциальная кривая внутреннего вращения вокруг связи C-N в формамиде, рассчитанная методом *ab initio* [55]

Хотя эти расчеты не выявляют разницы в устойчивости *цис*- и *транс*-форм, экспериментальные и теоретические данные для N-метилацетамида и других пептидов показывают существенную разницу в энергиях обеих форм [36,56], составляющую 3–5 ккал/моль. Эта разница возникает вследствие отталкивающих невалентных взаимодействий в *цис*-амидах [36,57]. *Цис*-амидная связь превалирует в лактамах с числом атомов в цикле, не превышающем 11–12, и наблюдается в линейных амидах, когда заместителем при карбонильном C-атоме является атом водорода или атом азота имеет третичный характер [50,58,59].

1.2.2. Электронная структура

Атомы, составляющие амидную группу, располагают гибридными электронными атомными орбиталями, образующими σ - и π -связи. Кроме того, гетероатомы N и O имеют соответственно одну и две неподеленные пары электронов. Особенностью амидной группы является то, что неподеленная пара электронов атома азота способна взаимодействовать с валентной p -орбитой атома углерода, придавая C-N-связи характер частично двойной связи (рис.4). Это и может быть представлено резонансными формулами (I) и (II) [14].

Многочисленные расчеты полуэмпирическими и неэмпирическими методами

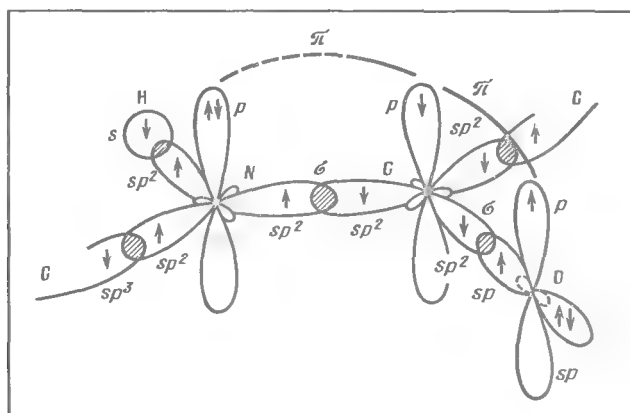


Рис.4. Электронные конфигурации атомов пептидной группы

квантовой химии [12,38,55,60-63] позволяют оценить величины зарядов на каждом атоме и порядки связей в амидной группе. Хотя получающиеся величины зависят от метода расчета, общая характеристика распределения электронной плотности оказывается весьма сходной (табл.4). Исследования колебательных спектров амидов [61,66] позволяют найти силовые постоянные и порядки связей. Полученные данные в целом согласуются с резонансной структурой амидной связи, а также с экспериментально найденными характеристиками, однако имеются и некоторые особенности, на которые необходимо обратить внимание. Для

Таблица 4. Распределение зарядов, порядки связей и силовые постоянные амидов

Соединение	Заряды			π-Порядок		Силовые постоянные, мдин/А		Литера- турный источ- ник
	O	C*	N	C=O	C=N	K _{CO}	K _{CN}	
Формамид	-0,403	+0,389	-0,608	-	-	-	-	[60]
		-		1,1	0,6	12,08	8,14	[64]
	-0,473	+0,247	-0,063	-	-	-	-	[65]
	-0,377	+0,258	-0,758	-	-	-	-	[12]
	-0,62	+0,53	-0,88	-	-	-	-	[63]
Формамид (кристалл)	-	-	-	0,85	0,85	10,18	9,22	[61]
Ацетамид	-0,63	+0,72	-0,91	1,0	0,6	11,45	8,14	[63,64]
N-метил- ацетамид	-0,64	+0,73	-0,85	0,98	0,65	11,32	8,27	[63,64]
Ацетон	-0,316	+0,132	-	1,0	-	11,45	-	[61]
Метиламин	-	-	-0,688	-	-	-	4,96	[61]

изолированной амидной молекулы порядок связи C=O близок к таковому в ацетоне, причем π-порядки связей C-N и C-O сильно отличаются. Однако расчет π-порядков связей из данных по ИК-спектрам кристаллов N-метилацетамида и из величин межатомных расстояний в кристалле этого соединения дает значения,

практически одинаковые для связей C-N и C-O [61]. Таким образом, в изолированной молекуле амида как расстояния C=O, так и порядок этой связи не согласуются с простой резонансной моделью.

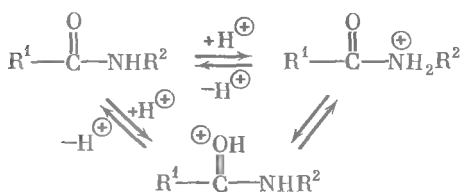
По-видимому, в изолированной амидной группе состояние гибридизации O-атома является промежуточным между sp^2 и sp^3 , вследствие чего орбитали n -электронов O-атома и π -электронов группы C=O неортогональны и взаимодействуют между собой. Подобное взаимодействие нарушается в кристаллах или растворах за счет образования связей с соседними молекулами растворителя [61]. Это представление согласуется со значениями $n-\pi^*$ -переходов в спектрах поглощения амидов, которые сдвинуты до 200–220 нм, в то время как для кетонов этот переход лежит при 270–300 нм. Таким образом, орбитали неподеленных пар электронов атома кислорода в амидах имеют, по-видимому, частично связывающий характер.

Другое объяснение независимости расстояния C=O от состояния гибридизации амидной группы [19] заключается в том, что перенос заряда с атома азота происходит не на атом кислорода, а на карбонильный углерод.

Так или иначе, электронная структура амидной связи характеризуется весьма высокой лабильностью и вместе с тем она обеспечивает прочность этой связи.

1.2.3. Свойства амидной группы

Описанная выше структура амидной группы определяет большинство ее физико-химических свойств [64]. Так, частичные отрицательные заряды на атомах кислорода и азота (см. табл.4) определяют способность амидов присоединять протон, выступая как слабое основание:



Протонирование амидов происходит преимущественно по атому кислорода [65], что обусловлено, во-первых, величиной зарядов на O- и N-атомах и, во-вторых, значительно меньшей потерей энергии резонансной стабилизации при протонировании кислорода, чем при присоединении протона к единственной свободной паре электронов N-атома.

В протонированных амидах сохраняется барьер вращения вокруг связи C-N, что видно из расщепления сигналов протона при N-атоме в спектрах ЯМР при низкой температуре [67]. Таким образом, в протонированном амиде сохраняется резонанс:



В протонированном амиде барьер вращения вокруг связи C-N несколько увеличивается. Так, величины, измеренные одним и тем же методом для амидного

диметилформамида и того же амида в 100%-ной серной кислоте, дали соответственно значения $\Delta G^\ddagger$ 17,84, $\Delta H^\ddagger$ 8,9 ккал/моль; $\Delta S^\ddagger$ -30 э.е. и $\Delta G^\ddagger$ 18,55, $\Delta H^\ddagger$ 12 ккал/моль; $\Delta S^\ddagger$ -22 э.е. [68]. Протонирование также, по-видимому, несколько затрудняет внеплоскостную деформацию амидной группы [34].

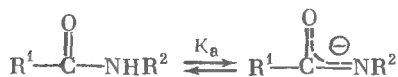
Амиды - очень слабые основания. Значения pK_a некоторых амидов приведены ниже [64]:



Соединение	$-pK_a$	Соединение	$-pK_a$
Ацетамид	0,35	N-Бутирилглицин	1,73
Пропионамид	0,57	N-Ацетилглицин	2,1
N-Метилацетамид	1,0	n-Нитробензамид	2,22
N,N-Диметилбензамид	1,2	Глицинамид	3,1
N-Метилбензамид	1,5	Бутиролактam	0,4
Бензамид	1,54	Валеролактam	-0,6

Заместители в амидной группе оказывают влияние на их основность за счет индуктивных, резонансных и стерических эффектов. Так, в ряду алкилзамещенных ацетамидов наблюдается хорошая корреляция $\lg K_a$ и константы σ^* Тафта с $\rho^* = -1,2$ [69]. Для замещенных в кольцо ароматических амидов наблюдается корреляция основности с σ -константами Гаммета [70].

Амиды могут выступать и как слабые кислоты:



Значения pK_a кислотной диссоциации ряда амидов в изопропиловом спирте, содержащем изопропилат натрия, приведены ниже [71]:

Соединение	pK_a	Соединение	pK_a
Формамид	17,2	N-Метилбензамид	>19,0
Ацетамид	17,6	n-Нитробензамид	19,85
Бензамид	>19,0	Бензанилид	16,5

Характерным свойством амидной группы является способность к образованию водородной связи [72]. При этом она может выступать в качестве донора и в качестве акцептора такой связи. Акцептором, в согласии с данными по протонированию амидов и с ИК-спектрами [64], является атом кислорода. Способность амидов образовывать Н-связь коррелирует со способностью к протонированию, т.е. с их основностью. Однако энтальпия водородной связи в 6-7 раз ниже, чем энтальпия протонирования [73].

Исследования водородных связей в кристаллах [74] дают следующие значения длин водородных связей в амидах и пептидах (приведены средние значения для 46 соединений):



X=	COO ⁻	$\begin{array}{c} \text{C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	C=O	H ₂ O	N(имидазол)	Cl ⁻
$r_{\text{N-X}}$	2,97±0,1	2,99±0,11	2,97±0,11	2,90	3,0	3,26

Как видно, расстояния $r_{\text{N-X}}$ мало зависят от природы акцептора, однако существует довольно сильная зависимость этого расстояния от природы донора водородной связи. Об этом свидетельствуют как экспериментальные [75-78], так и расчетные [62,63,79-81] данные. Основной вклад в свободную энергию водородной связи вносит энтальпия (табл.5).

Таблица 5. Термодинамические параметры водородных связей амидов с фенолом

Акцептор Н-связи	$-\Delta G_{\text{O}}^{\circ}$, ккал/моль	$-\Delta H_{\text{O}}^{\circ}$, ккал/моль	$-\Delta S_{\text{O}}^{\circ}$, э.е.	Литературный источник
N,N-Диметилформамид	2,49	6,1	12,7	[82]
N-Метилацетамид	2,87	4,0	-	[75]
N,N-Диметилацетамид	2,94	6,4	11,7	[82]
N,N-Дифенилацетамид	2,35	5,2	9,7	[76]
N,N-Диметилхлорацетамид	2,18	4,7	8,5	[82]
N,N-Диметилтрихлорацетамид	2,08	3,8	5,5	[82]
N-Бензоилпиперидин	2,21	4,2	6,9	[76]
ε-Валеролактam*	2,90	5,3	8,2	[83]
ε-Капролактam**	2,92	5,2	7,8	[83]

* В CCl₄ при 25°C.
 ** Близкие значения получены для самоассоциации [84].

Расчетные и экспериментальные данные показывают, что водородная связь амида с амидом примерно на 3 ккал/моль прочнее, чем связь амида с водой и с альдегидом [77-79].

Важной характеристикой водородной связи является ее направление. Водородная связь направлена к свободной паре электронов атома-акцептора [85]. Оптимальными являются почти линейные связи (угол N-H...O>150°). Расчет двугранных углов N-H...O=C дает значение $\theta \approx 60^\circ$ [79].

Поскольку образование Н-связи может стабилизировать разделение зарядов в амидной группе, барьер внутреннего вращения вокруг связи C-N может при этом повышаться. Действительно, было показано, что в диметилформамиде при образовании Н-связи свободная энергия активации *цис-транс*-перехода увеличивается на 1,2 ккал/моль [86]. Однако исследование корреляционных зависимостей свободных энергий активации *цис-транс*-переходов приводит к противоположному выводу о понижении энергии активации при образовании водородной связи [53].

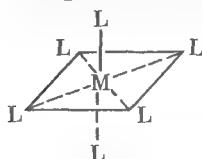
Атом кислорода карбонильной группы амидов может акцептировать две Н-связи ("трехцентровая" связь). В большинстве случаев это происходит тогда, ко-

гда атом-донор протона несет формальный положительный заряд [87].

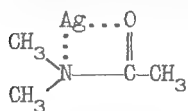
Способность амидов быть донорами и акцепторами водородных связей определяет способность их к гидратации в водных растворах [88], а также ассоциацию в неполярных растворителях. Свободная энергия ассоциации двух молекул N-метилацетамида в хлороформе достигает $-3,5$ ккал/моль [89].

Еще один тип водородных связей, обнаруженный сравнительно недавно [90], — это связь амидного протона (и других доноров) с центром ароматического кольца. Она возникает за счет слабого отрицательного заряда, создаваемого π -электронами. Энтальпия такой связи ≈ 3 ккал/моль, а расстояние — $3,4 \text{ \AA}$. Образование амидами водородных связей является лишь одним, хотя и очень важным примером способности амидной группы к образованию комплексов. Другим примером являются комплексы амидов с металлами, исследование которых важно с точки зрения понимания структуры и функции многочисленных металло-держающих ферментов (см.: обзор [91]).

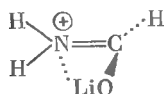
Амиды образуют комплексы с самыми разными металлами [92]. При этом, как правило, наблюдается сдвиг в область низких частот полосы амид I, что свидетельствует в пользу участия в комплексообразовании карбонильной группы амида. Металлы переходной группы способны использовать максимум координационных связей при образовании комплексов с амидами. Так, никель (II) и хром (III) образуют октаэдрические комплексы типа:



где L — амид или лактам [93]. Некоторые одновалентные ионы дают комплексы с амидами, присоединяясь по атому азота. Так, ион серебра связывается с диметилацетамидом, образуя комплекс типа [94]:



Интересно отметить, что барьер внутреннего вращения вокруг связи C-N в комплексах с металлами понижается [94,95]. Так, в комплексе с серебром свободная энергия активации *цис-транс*-перехода понижается с 21 ккал/моль (для свободного амида) до 19 ккал/моль [94]. Квантовохимические исследования лигандных комплексов амидов показали, что металл способен давать мостиковый комплекс типа [95]:

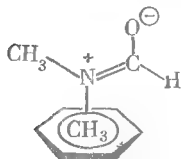


Именно образование таких комплексов объясняет понижение барьера внутреннего вращения, так как их структура близка к структуре переходного состояния при *цис-транс*-изомеризации.

Образование комплексов амидов с металлами приводит к изменению геометрии амидной группы. Так, $r_{C=O}$ уменьшается на $\approx 0,02 \text{ \AA}$ и наблюдаются хотя и не-

большие, но вполне реальные отклонения от плоской конфигурации амидной группы [92,96].

Еще один тип комплексов, которые способны образовывать амиды, — это π -комплексы. Обстоятельное исследование ЯМР-спектров диметилформамида в различных ароматических растворителях [97] показало, что амид образует с ними комплексы, которым было приписано строение:



Наконец, представление о структуре амидной группы как резонансного гибрида нейтральной и ионной форм приводит к еще нескольким следствиям. Во-первых, амидная группа должна обладать диамагнитной анизотропией. Действительно, было показано [98], что полипептиды, не содержащие ароматических групп, все же обладают заметной диамагнитной анизотропией. Была предложена теория этого явления, основанная на подвижности электронов в амидной группе, и вычислена константа молярной диамагнитной анизотропии амидной группы, равная $-5,36 \cdot 10^{-6}$ см $\cdot$ г $\cdot$ зл.ед. [99]. Во-вторых, частично двойной характер связи C-N в амидах должен приводить к возможности передачи через амидную группу электронных эффектов заместителей. Вначале [100,101] были получены противоречивые данные в отношении возможности передачи электронного эффекта через амидную связь. В дальнейшем обстоятельное исследование этого вопроса [102] показало, что такая передача существует, причем индуктивный эффект заместителя передается слабее от карбонильной части амидной связи, чем от ее аминной части.

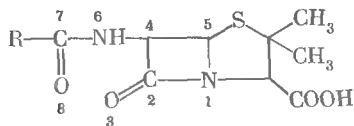
Следует отметить, что представления о наличии амидимидольной таутомерии в линейных амидах [103] не получили подтверждения при дальнейших исследованиях [104].

1.3. Необычные (непептидные) амидные связи и другие связи производных карбоновых кислот

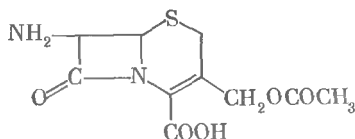
В этом разделе будут рассмотрены два типа связей, расщепляемых амидгидролазами, — β -лактамы и сложнэфирные.

1.3.1. β -Лактамы

β -Лактамное кольцо входит в состав антибиотиков группы пенициллинов (III) и цефалоспоринов (IV) и расщепляется β -лактамазами:



III



IV

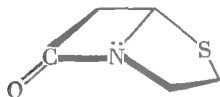
Амидная группа, входящая в состав β -лактамов, обладает необычными свойствами, в частности ее гидролиз в отсутствие ферментов обуславливает неустойчивость пенициллинов в водных растворах. Это связано с пониженным резонансом в амидной группе β -лактамов [105,106]. Показано, что атом азота в пенициллинах расположен вне плоскости заместителей ($\Delta_N = 0,4 \text{ \AA}$) [108]. Аналогичная ситуация имеет место у цефаллоспоринов [105].

Рентгеноструктурные исследования пенициллинов [107,109] показывают, что β -лактамный цикл сильно напряжен. В табл.6 приведены межатомные расстояния

Таблица 6. Межатомные расстояния и углы в натриевой соли бензилпенициллина [107]

Связь	г, $\text{\AA}$	Угол	τ , град.	Связь	г, $\text{\AA}$	Угол	τ , град.
N_1-C_2	1,39	$C_5N_1C_2$	95	C_2-C_4	1,49	$C_2C_4C_5$	86
C_2-O_3	1,29	$N_1C_2C_4$	92	C_5-N_1	1,38	N_1CO_3	134
						$C_4C_5N_1$	87

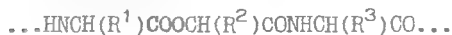
и углы β -лактамного цикла в пенициллинах. Таким образом, β -лактамный цикл - почти плоский прямоугольник. Характерно, что связь C-O в β -лактамном цикле существенно длиннее, чем такая же связь в обычных амидах. Кроме того, β -лактамный цикл и тиазолиновое кольцо располагаются по отношению один к другому под углом $\approx 120^\circ$. Все это исключает возможность взаимодействия неподеленной пары электронов атома азота с π -электронами двойной связи:



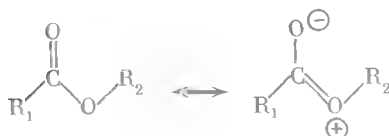
Частота полосы амид I в пенициллинах сдвинута до 1770 см^{-1} , тогда как у моноциклических β -лактамов эта полоса имеет значение 1730 см^{-1} , а у обычных амидов - 1665 см^{-1} [110].

1.3.2. Сложноэфирная связь

Сложноэфирные связи, расщепляемые некоторыми протеолитическими ферментами, - это связи в эфирах ациламинокислот, в некоторых, обычно активированных эфирах карбоновых кислот и депептидах, построенных из чередующихся аминокислотных остатков:

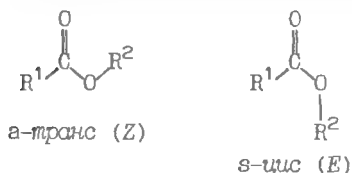


В сложных эфирах возможно существование резонансных структур (V) и (VI)



как следствие взаимодействия неподеленных пар эфирного атома кислорода с π -связью карбонильной группы. Однако из-за более высокой электроотрицательности атома O по сравнению с N вклад структуры VI составляет 15% [14].

В соответствии с этим сложные эфиры существуют в двух формах:



Энергия резонансной стабилизации в сложноэфирной группе близка к таковой для амидов (≈ 20 ккал/моль) [14] или даже несколько выше [111]. Однако изменение свободной энергии активации *S-цис-S-транс*-перехода у сложных эфиров ниже, чем у амидов, и составляет около 7-10 ккал/моль [19,112,113].

Такая противоречивая ситуация может быть связана [111] с тем, что в переходном состоянии *цис-транс*-изомеризации эфирная связь сохраняет частично энергию резонансной стабилизации за счет взаимодействия одной из двух свободных электронных пар спиртового атома кислорода с π -электронами двойной связи (рис.5).

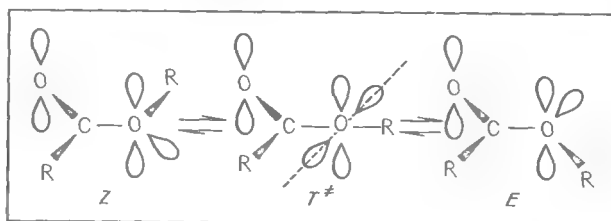


Рис.5. Транс (Z)-цис (E)-изомеризация сложных эфиров
Переходное состояние обозначено T^* [111]

Длины связей в сложноэфирной группе по данным дифракции электронов в газовой фазе [114] приблизительно такие же, как длины связей в амидной группе, и так же, как и в последней, они изменяются при переходе от индивидуальных молекул к кристаллам (табл.7). Силовые постоянные в группе COOR сни-

Таблица 7. Геометрические параметры сложноэфирной группы

Соединение	$r, \text{\AA}$			$\tau, \text{град.}$		Литературный источник
	C=O	C-OR	O-R	O=C-O	C-O-C	
Метилформиат	1,22	1,37	1,47	123	112	[114]
Метилацетат	1,22	1,36	1,46	124	113	[114]
Диэтилтерефталат	1,28	1,32	1,47	125	117	[115]

жены по сравнению с амидной группой и соответственно вычисленные из этих данных π -порядки для связей C-OR ниже, чем для связи C-N у амидов (табл.8).

Все эти данные свидетельствуют о том, что сложноэфирная связь в меньшей степени резонансно стабилизирована, чем амидная.

Необходимо отметить, что в газовой фазе сложноэфирная группа в эфирах не

является плоской. По данным дифракции электронов в метилформате, метилацетате и других эфирах угол между плоскостями $R^1-C=O$ и $C-O-R^2$ составляет в среднем 25° [114]. В кристаллах такого искажения плоской конфигурации не наблюдается [115].

Сложные эфиры – еще более слабые основания, чем амиды [116]. Так, значение pK_a для присоединения протона у эфиров бензойной кислоты лежит в области $-7,5$ [117].

Таблица 8. Заряды на атомах, порядок связей и силовые постоянные сложных эфиров (рассчитано методом CNDO/2)

Соединение	Заряды			π -Порядок		Силовые постоянные, мдин/Å	
	C'	$O_{\text{карбонил}}$	$O_{\text{спирт}}$	C-O	C=O		
						C-O	C=O
$HCOOCH_3$	0,381	-0,290	-0,199	0,053 0,30*	0,875 1,09*	6,74	11,83
CH_3COOCH_3	0,395	-0,335	-0,224	0,016 0,35*	0,777 1,02*	7,00	11,51
$CH_3CONHCH_2COOCH_3$	0,372	-0,334	-0,217	0,028	0,777		-

*Рассчитано из силовых постоянных [61].

1.4. Производные аминокислот и пептидов

Кроме состояния самой расщепляемой группы важными характеристиками субстратов протеаз являются свойства боковых цепей аминокислотных остатков и их конформация. Структура и свойства боковых цепей природных аминокислот варьируют в широких пределах. С точки зрения ферментативного катализа наиболее существенными характеристиками являются зарядовое состояние боковой цепи, ее размер, гидрофобность, конформация как основной цепи полипептида, так и боковых цепей и конформационная подвижность. Эти свойства будут рассмотрены в этом разделе на примере ациламинокислот и простых пептидов.

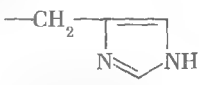
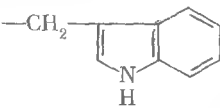
1.4.1. Состояние ионизации и гидрофобность

Боковые цепи аминокислотных остатков по их состоянию ионизации в нейтральных водных растворах можно разделить на три группы: нейтральные, слабокислые и основные (табл.9). При pH 7 боковые цепи остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот несут отрицательные заряды, боковые цепи остатков лизина, аргинина практически полностью протонированы и несут положительный заряд, а боковая цепь гистидина и в меньшей степени цистеина имеют лишь частично положительный и отрицательный заряды соответственно. Фенольный гидроксил тирозина при этом значении pH протонирован и электронейтрален. Индольная группа триптофана имеет pK_a около -2 и может рассматриваться как нейтральная.

Количественной мерой степени гидрофобности аминокислотных остатков служит изменение свободной энергии, приходящееся на боковую цепь свободной

аминокислоты при ее переносе из неполярного или малополярного растворителя в воду. Существуют разные шкалы гидрофобности, когда в качестве растворителя используют этиловый спирт [118], *n*-октанол [119] (коэффициент π), гептан [121] и др. Применяют также шкалы, основанные на степени удерживания при высокоэффективной жидкостной хроматографии аминокислот [122] или показатель, равный изменению свободной энергии при переносе боковой цепи из вакуума в воду [120]. Эти показатели часто по-разному характеризуют боковые цепи аминокислот в отношении их гидрофобности. Так, например, при переносе из спирта в воду остатки лизина, аргинина и гистидина характеризуются как сла-

Таблица 9. Значение pK_a и степени гидрофобности боковых цепей аминокислот

Аминокислота	R	pK_a	ΔG , ккал/моль; спирт-вода [118]	π [119]	ΔG , ккал/моль; вакуум-вода [120]
Глицин	H		0	0	+2,39
Аланин	CH ₃		+0,73	+0,50	+1,94
Валин	CH(CH ₃) ₂		+1,69	+1,53	+1,99
Лейцин	CH ₂ CH(CH ₃) ₂		+2,42	+1,98	+2,28
Изолейцин	CH(CH ₃)C ₂ H ₅		+2,97	+2,04	+2,15
Серин	CH ₂ OH		+0,04	-1,03	-5,05
Треонин	CH(CH ₃)OH		+0,44	-0,77	-4,88
Аспарагин	CH ₂ CONH ₂		-0,01	-1,68	-10,95
Глутамин	(CH ₂) ₂ CONH ₂		-0,1	-1,22	-10,20
Аспарагиновая кислота	CH ₂ COOH	3,65	+0,54	-0,72	-9,68
Глутаминовая кислота	(CH ₂) ₂ COOH	4,25	+0,55	+0,29	-9,38
Гистидин		6,0	+1,4	-	-10,27
Лизин	(CH ₂) ₄ NH ₂	10,5	+1,5	+1,45	-9,52
Аргинин	(CH ₂) ₃ NHC(:NH)NH ₂	12,5	+0,73	-	-19,92
Цистеин	CH ₂ SH	8,2	+0,65	-	-1,24
Тирозин	CH ₂ C ₆ H ₄ -OH- <i>n</i>	10,0	+2,87	-	-6,11
Фенилаланин	CH ₂ C ₆ H ₅		+2,65	+2,69	-0,76
Триптофан			+3,0	-	-5,88
Цистин	-CH ₂ -S-S-CH ₂ -		+1,3	-	-1,48
Метионин	(CH ₂) ₂ SCH ₃		+2,6	-	-
Пролин	-(CH ₂) ₃ -		-	+1,2	-

бо гидрофобные, что обусловлено наличием у них значительного числа метиленовых и метиновых звеньев, вклад которых превышает вклад заряда. Эти же остатки, как показывает изменение свободной энергии при переносе из вакуума в воду, являются наиболее гидрофильными (см. табл.9).

Следует заметить, что представление об аддитивности индексов гидрофобности, по-видимому, не всегда соблюдается. Было показано [123], что полярные боковые цепи являются заметно более гидрофобными в составе белков и олигопептидов, чем в свободных аминокислотах, из-за влияния фланкирующих пептидных связей. Образование α -спиральной конформации несколько снижает гидрофобность большинства боковых цепей аминокислот.

1.4.2. Конформация

В каждом аминокислотном остатке, входящем в полипептидную цепь (за исключением пролина), имеются две связи $N-C_\alpha$ и $C_\alpha-C'$, вокруг которых возможно свободное вращение. Кроме того, боковые цепи аминокислот имеют в большинстве случаев несколько одинарных связей, допускающих свободное вращение. Взаимо-

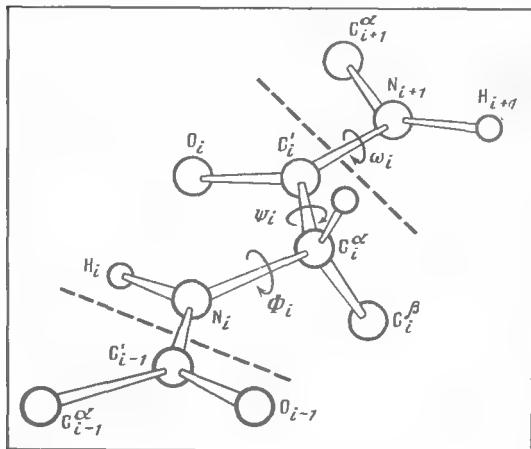


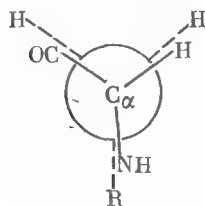
Рис.6. Обозначения двугранных углов в пептидной цепи в соответствии с рекомендациями Комиссии по биохимической номенклатуре [15]

N и C_α , C_α и C' . Цепь рассматривается от N - к C -концу и за нулевое значение угла ϕ принимается положение, когда связь $N-H$ находится в *цис*-ориентации к связи $C_\alpha-C'$ (рис.6). Изменение угла ϕ происходит путем вращения связи $C_\alpha-C'$ вокруг связи $N-C_\alpha$. Вращение по часовой стрелке дает значения углов от 0° до $+180^\circ$, против часовой стрелки – от 0° до -180° . За нулевое значение угла ψ принимают положение, когда связь $C_\alpha-N$ находится в *цис*-ориентации по отношению к связи $C'-O$. Значения углов здесь те же, что и в случае угла ϕ . Кроме углов ϕ и ψ , конформацию основной полипептидной цепи определяет двугранный угол ω , характеризующий состояние амидной связи.

Конформационное состояние боковых цепей описывается углами χ_1 , χ_2 и т.д., начиная от C_α -атома. За нулевое значение принимается конформация, в которой связь $C_\beta-C_\gamma$ находится в *цис*-ориентации по отношению к связи $C_\alpha-N$:

действия валентно не связанных групп в составе аминокислотного остатка и групп соседних остатков по цепи ("ближние" взаимодействия [124]) приводят к тому, что не все возможные взаимные положения групп оказываются разрешенными. Рассмотрим конформации основной и боковых цепей аминокислотных остатков (см.: обзоры [11,13]).

Номенклатура. В соответствии с рекомендациями Международной комиссии по номенклатуре [15] конформация основной цепи описывается двумя двугранными углами ϕ и ψ , характеризующими соответственно взаимную ориентацию заместителей при атомах



Основная цепь. Многочисленные рентгеноструктурные исследования пептидов [11,13,18] и белков [125-127], а также исследования пептидов в растворах, главным образом, методами ЯМР-спектроскопии [128-131] показывают, что конформационное состояние основной полипептидной цепи в подавляющем большинстве случаев совпадает с областями наименьших энергий, рассчитанными методами атом-атомных потенциалов или квантовохимическими методами [28,132-138].

Разрешенные по энергии значения углов ϕ и ψ обычно изображают диаграммами Рамачандрана [11] (рис. 7, а-в). Для метиламидов N-ацетилаланина и N-ацетилвалина разрешенными областями являются три, обозначаемые как области R, B и L. Для глицинового остатка конформационные возможности значительно выше. Область B соответствует β -структуре полипептидной цепи, а области R и L — соответственно правой и левой спиральным структурам. Переход из одной области в другую сопряжен обычно с преодолением значительного активационного барьера. Области R и L разделены барьером около 12 ккал/моль, однако барьер между областями R и B составляет лишь 1-3 ккал/моль.

Следует подчеркнуть, что нанесенные на карту изоэнергетические контуры —

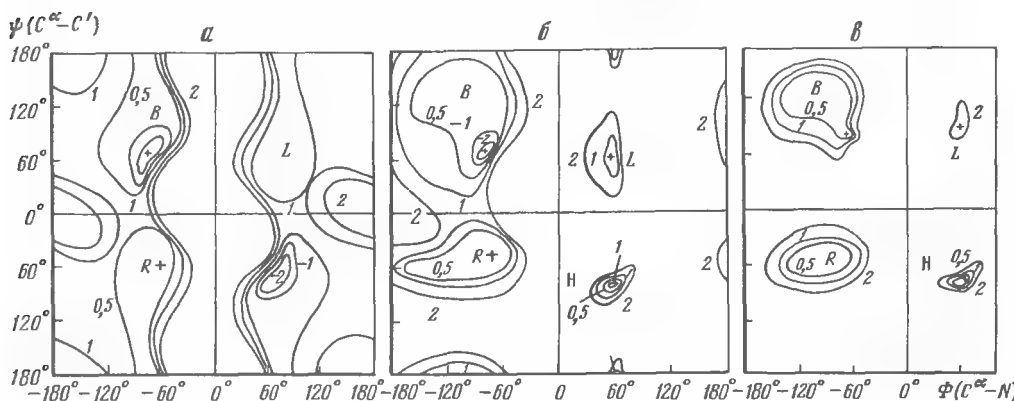


РИС. 7. Конформационные карты ϕ - ψ для метиламидов N-ацетилглицина (а) N-ацетил-L-аланина (б) и N-ацетил-L-валина (в) [132]

это контуры равных потенциальных энергий. Приведенные значения не позволяют оценить содержание каждой конформации, поскольку энтропийный вклад каждой из них может быть различен. Качественно энтропия данной конформации оценивается площадью минимума по конформационной карте. Попытки количественной оценки энтропии для нескольких конформаций пептидов сделаны в работах [136,139,140]. Согласно этим данным, например [136], для метиламида N-ацетилтриаланина конформация с параметрами α -спирали (ϕ -60° , ψ -60°) по свободной энергии на $\approx 4,7$ ккал/моль менее выгодна, чем конформация с параметрами β -структуры (ϕ -80° , ψ $+80^\circ$). Это соответствует отношению концентрации свернутой конформации к α -спиральной, равному $2,5 \cdot 10^3$.

Квантовохимические исследования [141] приводят к выводу, что конформация малых пептидов определяется в основном тремя факторами: отталкиванием не-связывающих орбиталей, образованием водородных связей и торсионными барьерами вокруг связей C-C и C-N. Кроме того, стабилизирующий эффект могут иметь π - π -взаимодействия, например, между ароматическим кольцом и амидной связью [142,143], а также H- π -взаимодействия между связью N-H одного остатка и группой C=O другого [144].

Важным при исследовании конформационных состояний пептидов является вопрос о влиянии на конформацию внешней среды. Тот факт, что экспериментально найденные конформации совпадают с рассчитанными по методу атом-атомных потенциалов, свидетельствует о том, что этот метод достаточно хорошо моделирует состояние пептида в водной среде. Было показано [145,146], что гидратация существенно не изменяет конформацию и флуктуационную динамику дипептидов типа AcAlaNHCH_3 . В то же время учет гидратации в расчетах показал [135], что минимум энергии метиламида N-ацетилаланина сдвигается со значений $\phi = -84^\circ$ и $\phi = -79^\circ$ до $\phi = -142^\circ$ и $\phi = 150^\circ$. Однако различие в энергиях этих конформаций очень невелико.

Боковые цепи. Изменение конформации боковой цепи обычно не требует значительных энергетических затрат. Различия в конформациях не превышают 3 ккал/моль. В кристаллах пептидов предпочтительно реализуются конформации с $\chi_1 = -60^\circ$, $+60^\circ$ и $+180^\circ$. Как видно из рис.8, все три значения χ_1 встречаются примерно с равной частотой, что же касается χ_2 , то значения этого угла лежат в области 60° - 120° . Исследования ЯМР-спектров растворов различных производных N-ацетилфенилаланина [147] показывают, что преобладающей является конформация с $\chi_1 = 180^\circ$, причем тип растворителя мало влияет на распределение конформаций (табл.10).

1.5 Белки как субстраты протеаз

Истинными субстратами большинства протеолитических ферментов являются белки. Целесообразно поэтому рассмотреть особенности их макромолекулярной структуры.

Амидные связи в белковой молекуле по своим параметрам практически не отличаются от связей в низкомолекулярных соединениях. Это относится к величинам межатомных расстояний и валентных углов, которые имеют те же значения, что и в простых пептидах и амидах [27]. Величины неплоской деформации амидной связи в белках не превышают таковые для других соединений, содержащих амидную группу. В качестве примера на рис.9 представлена гистограмма ω в миоглобине, показывающая, что подавляющее число амидных связей имеет *транс*-конфигурацию и вариации угла ω не превышают 15° . *Цис*-амидная группа встречается в некоторых белках [148-150] и пептидах [18], но это является скорее исключением, чем правилом.

Конформационное состояние аминокислотных остатков в белках также обычно совпадает с энергетически наиболее выгодными конформациями, найденными для производных ациламинокислот и пептидов [124,151]. Это обусловлено преобладающей ролью "ближних" взаимодействий в стабилизации конформации основной полипептидной цепи. Большинство остатков имеют значения углов ϕ и ψ , сов-

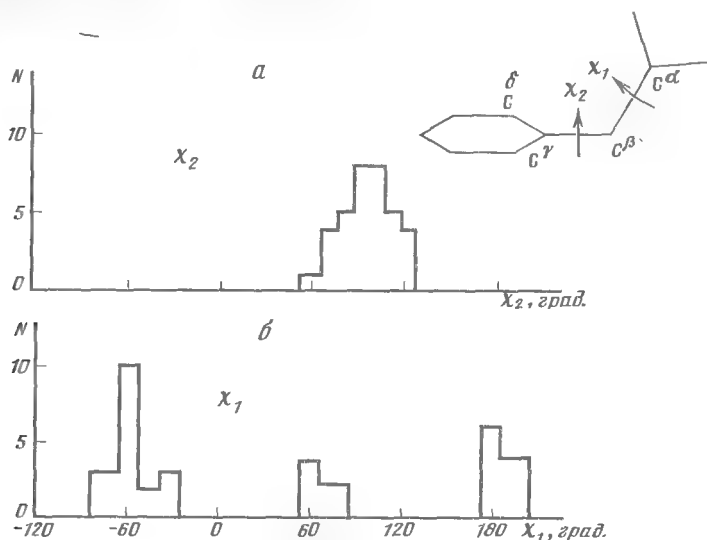


Рис.8. Гистограммы углов χ_2 боковой цепи фенилаланина (а) и χ_1 боковой цепи тирозина (б) [18]

падающие со значениями энергетически выгодных конформаций метиламидов N-ацетиламинокислот [124].

Значения углов ϕ и ψ аминокислотных остатков определяют тип вторичной структуры всей белковой глобулы.

Таблица 10. Конформации боковой цепи производных N-ацетилфенилаланина [147]

Соединение	Растворитель	Доля конформации с χ_1		
		+180°	+60°	-60°
AcPheOEt	$C_6H_5CH_3$	0,34	0,33	0,33
"	$(CH_3)_2SO$	0,58	0,31	0,11
"	D_2O	0,52	0,32	0,16
AcPheNH ₂	"	0,58	0,31	0,11
AcPheAlaOMe	"	0,66	0,16	0,18

В соответствии с преобладающим типом вторичной структуры предложено [152] различать четыре класса белков (рис.10): I – полностью α -спиральные; II – преимущественно содержащие β -структуру; III – белки, в которых α - и β -структуры разделены вдоль полипептидной цепи ($\alpha+\beta$), и IV – белки, в которых α - и β -структуры смешаны (α/β).

Вторичная структура белков определяется природой, последовательностью и конформационным состоянием аминокислотных остатков. Предпринимаются многочисленные попытки предсказания вторичной и третичной структуры белков на основе статистического анализа последовательностей аминокислот (см. в: [153]) и даже аминокислотного состава [154]. Следует отметить, что многие функционально близкие белки имеют сходную пространственную структуру, хотя у них очень мало общего в последовательности аминокислот [155]. И наоборот,

в ряде функционально различных белков обнаруживаются идентичные последовательности, имеющие разную конформацию [156].

Для многих белков характерно наличие доменов, т.е. пространственно ограниченных компактных частей белковой глобулы, соединенных между собой участком неупорядоченной полипептидной цепи. Между доменами имеется большое число нековалентных связей [13,157]. Домены возникают, по-видимому, при свертывании полипептидной цепи белка в процессе его биосинтеза, причем опреде-

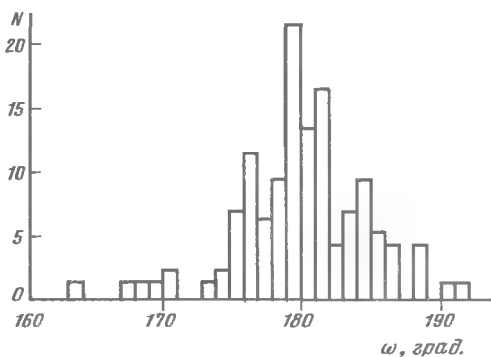


Рис. 9. Гистограмма углов ω в миоглобине [27]

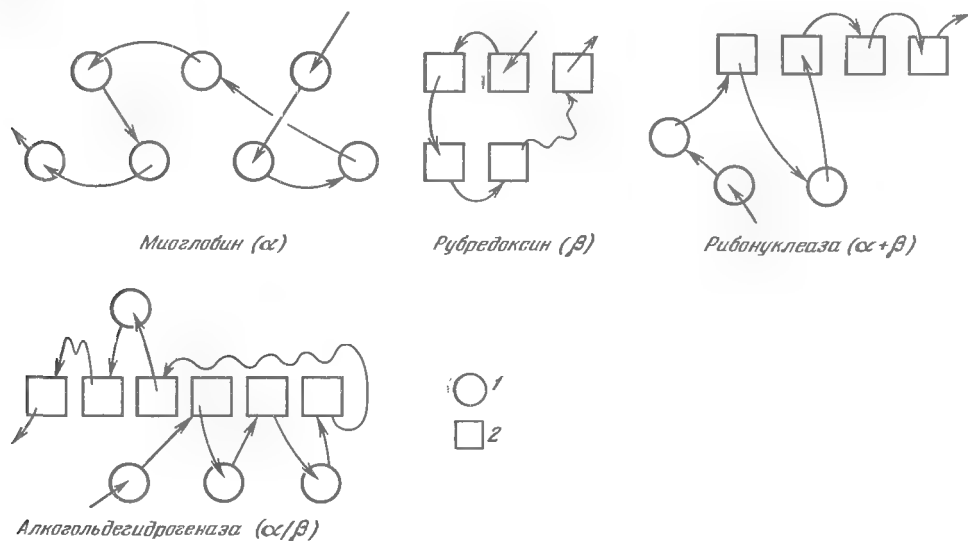


Рис. 10. Типы супервторичных структур [152]
1 - α -спираль; 2 - β -складчатый слой

ляющую роль играют так называемые центры нуклеации [158]. Число доменов в белковой молекуле зависит от размеров белка. Предложена [159] довольно простая зависимость, связывающая число доменов (D), число аминокислотных остатков (N) и число остатков в некой, произвольно выбранной структурной единице молекулы (u):

$$D = 2^{L-1}, \quad \text{где } L = \log_2(N/u)+1.$$

Наконец, многие белки состоят из субъединиц, не связанных между собой ковалентно. Такие субъединицы организованы в четвертичной структуре белка и могут играть важную функциональную роль.

Наиболее существенными особенностями белков с точки зрения их роли как субстратов протеолитических ферментов являются: 1) недоступность многих боковых цепей аминокислотных остатков вследствие погружения их в белковую глобулу или других стерических препятствий; 2) ограниченная возможность конформационных переходов, особенно основной цепи белка. Доступность тех или иных аминокислотных остатков внешнему реагенту или растворителю определяется положением этого остатка в глобуле белка. Большинство полярных и особенно заряженных боковых цепей располагаются на поверхности глобулы. Однако имеются заряженные остатки, маскированные внутри глобулы или в области субъединичных контактов. Такие остатки, как правило, образуют ионные пары или дают водородные связи с нейтральными полярными группами [160-162].

Распределение гидрофобных остатков в пространственной структуре белков, например тирозина и триптофана, очень неравномерно (табл.11). В то время как ни в одном из приведенных в табл.11 белков не обнаружено остатков триптофана, полностью экспонированных в окружающую среду, многие остатки тирозина занимают именно такое положение. Большинство остатков ароматических аминокислот может быть отнесено к "поверхностным", т.е. таким, которые частично погружены в глобулу белка или же прилегают своим ароматическим кольцом к другим группам.

Положение остатка в глобуле белка в значительной мере определяется возможностью его гидратации. Была обнаружена четкая линейная корреляция (рис. 11) между положением боковых цепей аминокислотных остатков в белке и степенью их гидратации [120].

Аминокислотные остатки могут маскироваться углеводными цепями в глико-протеидах или липидами, если белок прочно ассоциирован с мембраной [164].

Таблица 11. Распределение остатков тирозина и триптофана в кристаллах некоторых белков [163]

Белок	Тирозин			Триптофан		
	внутри	на поверхности	снаружи	внутри	на поверхности	снаружи
Карбоксипептидаза	1	13	4	2	6	0
α -Химотрипсин	0	2	2	2	6	0
Эластаза	1		10	4	3	0
Феррицитохром С	2	2	0	1	0	0
Миоглобин	1	0	2	1	5	0
Рибонуклеаза А	2	1	3	0	0	0
Субтилизин	0		10	0		3

Хотя белки являются компактными, термодинамически стабильными образованиями даже в отсутствие внешних воздействий, возможны их конформационные изменения и определенная внутримолекулярная подвижность [165,166]. Даже боковые цепи, погруженные внутрь глобулы, способны во многих случаях к свободному вращению [167].

Все сказанное выше относится к нативной структуре белков. Однако многие белки расщепляются протеолитическими ферментами в денатурированном состоянии, т.е. состоянии, когда их пространственная организация существенно

изменилась под влиянием внешних воздействий. Такими внешними воздействиями могут быть, например, pH среды, температура и т.п. Пищеварительные ферменты, функционирующие в желудке, атакуют белки, подвергшиеся кислотной денатурации.

Проблемам денатурации белков посвящено огромное число работ (см.: обзоры [168,169]). Здесь мы не будем рассматривать эту проблему. Укажем только, что денатурация приводит к существенному "демаскированию" большинства аминокислотных остатков, делая их доступными воздействию внешних реагентов, в том числе ферментов. Состояние расщепляемой связи, даже в таких экстремальных условиях, как условия кислой среды желудка (pH около 1), будет изменяться в той мере, в какой это наблюдается для низкомолекулярных веществ. Что же касается конформации основной и боковых цепей аминокислот в денатурированном белке, то она, очевидно, также будет оставаться в пределах энергетически разрешенных областей с учетом, конечно, изменившегося состояния ионизации заряженных групп. Следствием денатурации будет главным образом увеличение числа доступных внешним реагентам остатков аминокислот и снятие ограничений конформационной подвижности основной цепи, налагаемых в нативной структуре "дальними" взаимодействиями. Эти факторы будут способствовать катализируемому ферментами расщеплению амидных связей.

1.6. Вода

Гидролитические реакции, по определению, включают в качестве одного из реагентов воду. Поэтому необходимо очень кратко охарактеризовать структуру и этого "субстрата" амидгидролаз. Структуре и свойствам воды посвящены многочисленные исследования (см., например: обзоры [170,171]). Структура молекулы воды представлена на рис.12.

Из-за разной электроотрицательности атомов кислорода и водорода и нелинейной структуры вода обладает значительным дипольным моментом ($\mu=1,85$ D). Это приводит к тому, что в конденсированном состоянии молекулы воды сильно взаимодействуют между собой и с другими полярными молекулами, образуя трехмерную сетку водородных связей:

3. В.К. Антонов

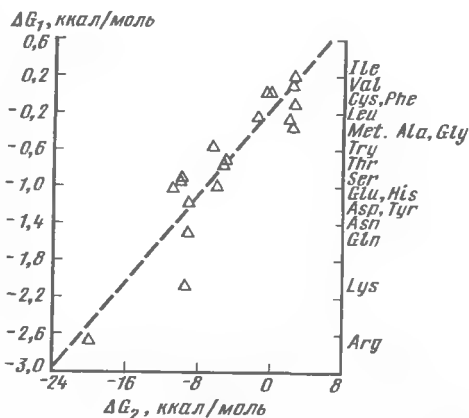


Рис.11. Корреляция изменений свободной энергии переноса боковой цепи аминокислотных остатков (12 белков) из внутренних частей белковой глобулы на ее поверхность (ΔG_1) с изменением свободной энергии переноса остатка из вакуума в воду (ΔG_2) при pH 7 [120]

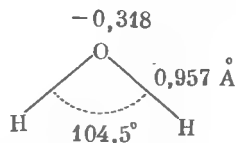
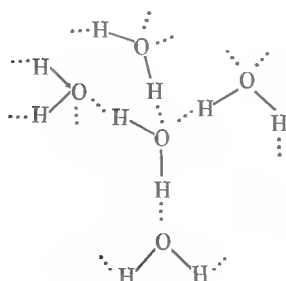


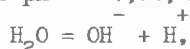
Рис.12. Длина связи, двугранный угол и заряд на атоме кислорода в молекуле воды



Многие рассчитанные и экспериментальные характеристики воды приведены в работах [172,173]. Из них следует отметить значения констант ионизации в реакции:



где $\text{pK} = -1,74$, и в реакции:



где $\text{pK}_a = 15,74$.

1.7. Заключение

При кажущейся на первый взгляд однотипности субстратов амидгидролаз внимательный анализ выявляет их поразительное разнообразие. Различие в пространственной структуре белков, в доступности тех или иных аминокислотных остатков внешним реагентам, в их конформационной подвижности определяют все разнообразие в действии на них протеолитических ферментов. Это же определяется широким набором свойств боковых цепей и ограниченным конформационным состоянием основной цепи, приводящих во многих случаях к строго специфическим фермент-субстратным взаимодействиям. Сама расщепляемая амидная группа представляет собой уникальную структуру, сочетающую два столь противоположных свойства, как устойчивость и лабильность. Устойчивость амидной связи характеризуется крайне низкими скоростями ее распада в отсутствие каталитических влияний на эту реакцию. Лабильность как геометрии, так и особенно электронной структуры амидной группы собственно и обуславливает ее чувствительность к внешним воздействиям и способность в ходе гидролитического расщепления подвергаться различного рода изменениям под действием катализаторов, в частности ферментов.

2.1. Классификация

Гидролиз амидных связей в различных веществах, рассмотренных в предыдущей главе, в основном в белках и пептидах, катализируется многочисленными ферментами, относящимися по современной классификации к классу гидролаз (класс 3). В составе этого класса ферменты, действующие на пептидные связи, образуют особый подкласс пептидгидролаз (3.4). Поскольку мы будем рассматривать здесь не только ферменты, катализирующие гидролиз амидных связей в белках и пептидах, но и многие ферменты, действующие на другие типы амидных связей, целесообразно ввести общий для всех них термин – амидгидролазы. Таким образом, амидгидролазы можно разделить на две группы: протеазы (3.4), действующие на амидные связи в белках и пептидах, и амидазы (часть ферментов подкласса 3.5), действующие на амидные связи, иные, чем пептидные.

Принятая в настоящее время классификация ферментов этих подклассов основана на двух важных критериях: специфичности и структуре каталитического аппарата ферментов [10]. В соответствии со специфичностью амидгидролазы можно разделить на подклассы, как это показано на рис.13 (ср.: [174]). В то время как пептидазы классифицируются по положению расщепляемой связи в пептидной цепи (α-карбоксипептидазы – еще и по активному центру), протеиназы (эндопептидазы) классифицируются по структуре активного центра.

Такое положение нельзя признать удовлетворительным. Кроме того, что здесь смешиваются два совершенно разных признака, появляется все больше данных о существовании ферментов, обладающих как экзо-, так и эндопептидазной активностью (см. ниже).

Успехи в изучении химии амидгидролаз позволяют уже сегодня отнести многие пептидазы и амидазы к одному из четырех структурных типов: сериновым, цистеиновым, аспартатным или металлсодержащим амидгидролазам [175]. Конечно, для многих ферментов такое отнесение носит предварительный характер, так как основано не на точном знании структуры и механизма катализа, а на косвенных данных о действии на ферменты тех или иных специфических ингибиторов. Более того, нельзя исключить возможность обнаружения среди еще не классифицированных амидгидролаз ферментов, принципиально отличающихся от указанных четырех групп по структуре и механизму действия. Однако преимущества такой единой классификации очевидны: она создает хорошую основу для рассмотрения структуры и механизма действия ферментов с единых химических позиций.

В табл.12 сделана попытка распределить известные в настоящее время амидгидролазы по типам строения их каталитического аппарата. Несомненно, что в дальнейшем это распределение будет совершенствоваться и уточняться.

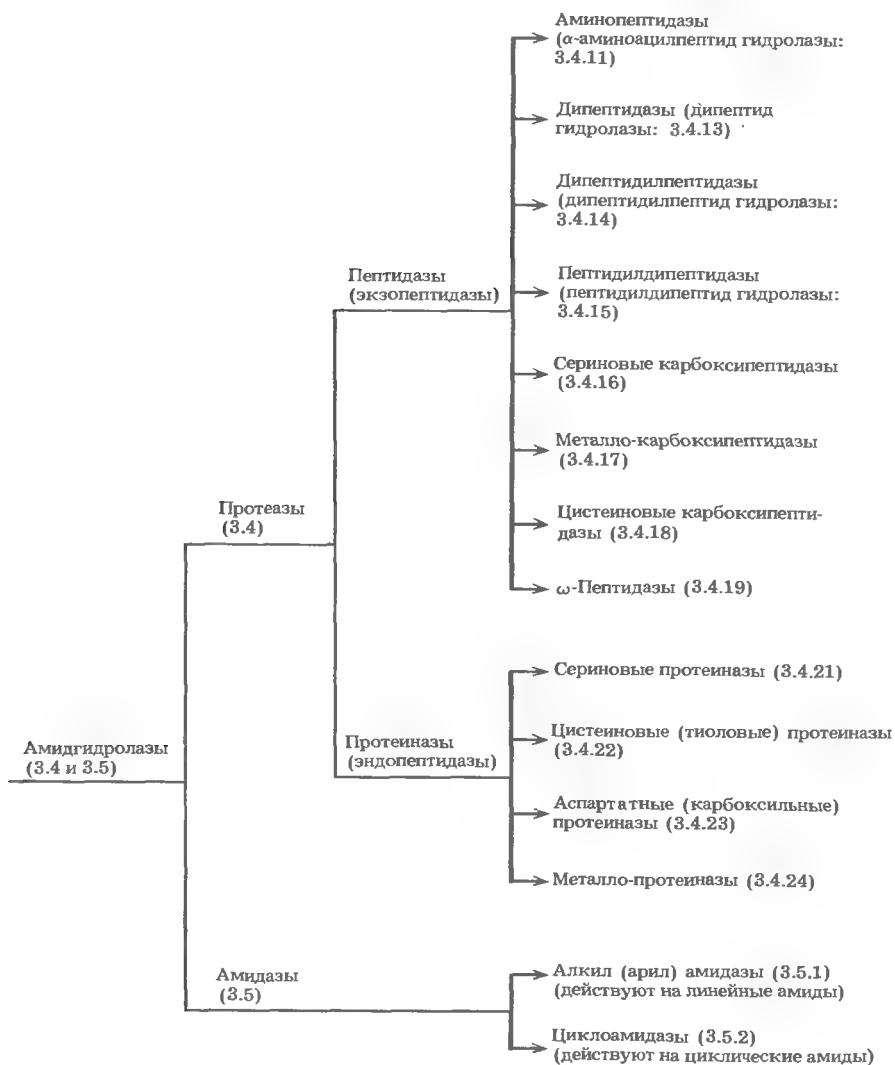


Рис.13. Схема классификации амидгидролаз
В скобках приведены номера по КФ [10]

2.2. Распространение

Амидгидролазы представляют собой наиболее обширную группу ферментов. В табл.12 перечислено около шестисот относительно хорошо охарактеризованных ферментов этого типа. Несомненно, что число их на самом деле во много раз больше. Амидгидролазы встречаются во всех без исключения живых организмах, начиная от вирусов и кончая человеком.

Особенно богатым источником этих ферментов являются микроорганизмы. Некоторые виды бактерий, например *Bacillus subtilis*, образуют до 1 г протео-

литических ферментов на 1 л питательной среды [176]. Из такого классического объекта молекулярной биологии, как кишечная палочка (*Escherichia coli*), выделено и охарактеризовано не менее 25 различных амидгидролаз.

Следует отметить, что в последние годы появляется все больше искусственных, часто необычных источников амидгидролаз. Это обусловлено развитием методов рекомбинантных ДНК [177], позволяющих получать в микробных, дрожжевых и некоторых животных клетках ферменты, этим клеткам совершенно несвойственные. Еще довольно слабо исследованы в отношении содержания протеиназ и пептидаз такие многочисленные представители царства живого, как растения и насекомые.

По своей локализации различают вне- и внутриклеточные амидгидролазы. Первые секретируются микроорганизмами в окружающую среду или же присутствуют в различных биологических жидкостях - крови, лимфе, желудочном соке и т.д. Вторые обычно локализованы в субклеточных частицах - митохондриях, микросомах, лизосомах и т.п. - и более или менее связаны с мембранами клетки. Однако есть ферменты, локализованные в растворимой фазе клетки - цитозоле.

В растениях амидгидролазы встречаются в покоящихся и прорастающих семенах, а также в листьях, стеблях, корнях и плодах.

Многие протеолитические ферменты (пептидазы и протеиназы), особенно у животных, продуцируются клеткой в виде неактивных предшественников - зимогенов. Превращение зимогена в активный фермент (активация) происходит непосредственно в том месте организма, где необходимо его участие в химических превращениях метаболитов (см. гл.5).

2.3. Характеристика отдельных типов амидгидролаз

Описанию амидгидролаз посвящены многочисленные обзоры (например: [178-183]), освещающие различные аспекты исследований этого класса ферментов. В каждой из четырех групп амидгидролаз трудно выделить что-то общее по источникам получения, специфичности, т.е. способности катализировать гидролиз амидных связей в эндо- или экзоположениях полипептидной цепи, а также по величинам молекулярной массы, наличию или отсутствию субъединиц. Можно лишь отметить, что среди аспартатных амидгидролаз практически отсутствуют экзопептидазы. Аспартатные амидгидролазы не найдены у прокариот. В то же время экзопептидазы наиболее часто представлены металлсодержащими амидгидролазами. Эта последняя группа ферментов отсутствует среди вирусных протеиназ.

Общие признаки, характеризующие отдельные группы ферментов, заключаются в следующем: все сериновые амидгидролазы чувствительны к специфическим ингибиторам, взаимодействующим с каталитически активным остатком серина, - диизопропилфторфосфату (ДИФ), фенилметилсульфонилфториду (ФМСФ) и некоторым ингибиторам микробного, животного и растительного происхождения. Эти ингибиторы подавляют их каталитическую активность. Следует отметить, что существуют количественные различия в действии тех или иных ингибиторов на разные ферменты этой группы. Так, скорость и степень подавления активности (ингибирования) ДИФ разных амидгидролаз может быть различной. Многие сериновые амидгидролазы, чувствительные к ДИФ, не подавляются ФМСФ. Заведомо, серино-

Таблица 12. Амидгидролазы

N п/п	Номер по КФ	Название фермента	Источник	M, кДа	Данные о структуре*	pH опт	Примечание	Литера- турный источ- ник**
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	3.4.14.2	Дипептидил-пептидаза II То же	Сериновые амидгидролазы					
2		"	Гипофиз быка	130	(2×54), гл.	5-5,5		[213]
3		"	Эпидидимис хряка	110	гл.	6		[214]
4		"	<i>Xenopus laevis</i>	98	1 ц.	8	Мембранный; USCV	[215]
5		"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40		7-7,5		[216]
6		"	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	160	(2×75)	7,4-7,8		[217]
7	3.4.14.4	Дипептидил-пептидаза III То же	Хрусталик человека	80	1 ц.	8-9	SH-зависимый	[218]
8		"	Мозг крыс	80	1 ц.	8-9		[219, 220]
9	3.4.14.5	Дипептидил-пептидаза IV То же	Фибробласты человека	400	2 ц. (125, 135)	7,8-8	Мембранный	[221]
10		"	Почки свиньи	280	(2×130)	7,7	"	[222-224]
11		"	Почки ягненка	230	(2×115)	7,8	"	[225]
12		"	Разные органы крыс	190- 266	(2×90-130) 1 ц.	7,5-8	"	[226, 227, 228]
13	3.4.14.8	Трипептидил-пептидаза I То же	Печень свиньи	360	2 субъеди- ниц	7,8-8	Растворимый	[229, 230]
14		"	Яичники свиньи	55		4,5-5		[231]
15	3.4.16.1	То же Сериновая карбоксипеп- тидаза	Печень, эритроциты Лизосомы печени крыс A,S	135 100	ассоциирован 3 ц. (20, 55, 25)	7,5 5,5	Катепсин A	[232-234] [235-237]
16		То же	То же	400	То же		"	[235-237]
17		Зерна ячменя	I	60	2 ц. (34, 26) гл., с.	5,5	SH-зависимый	[238, 239]
18		"	То же	60	То же	4,8-5,7		[238, 240]
19		"	III	48	1 ц., гл.	4-6	SH-зависимый	[241]
20		"	Зерна пшеницы	55	2 ц. (37, 26) гл., с.	4-5		[242]
21		"	То же	126	2 ц. (60, 63) гл., с.	4,4	SH-зависимый	[243]
22		"	Бобы	120		6	"Фасеолин"	[244]
23		"	Цитрусовые	93	1 ц., гл., с.	5,5		[245-247, 248]
		"	То же	96	1 ц., гл., с.	5,5		[247]
24		"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59	1 ц., гл., с.	4,3	Карбоксипеп- тидаза Y,	[249, 250, 251]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
51	3.4.21.4.	Трипсин	Поджелудочная железа человека	22,9	1ц.,с.	7-8	Две формы I, II	[291,293]
52		То же	быка	23,8	1ц.,с.	7-8	0а-зависимая	[292,293, 294,295] [293, 296-298]
53		"	свиньи	23,4	1ц.,с.	7-8		[298] [299]
54		"	овцы	25,5	1ц.,с.	7-8	0а-зависимая	[300,301, 302]
55		"	мышь	26,2	1ц.,с.	7-8	Катионный и анионный	[279] [303,304]
56		"	крысы	30	1ц.,с.	7-8		[305]
57		"	индейки	18,6	1ц.,с.	7-8	3 формы	[306]
58		"	акулы	21	1ц.,с.	7-8	pI 5	[307]
59		"	трески	24,2	1ц.,с.	7-8	"Спермозин"	[308]
60		"	морской еж	29	1ц.	8,5-9	2 формы А, В	[309,310]
61		"	асидия	27	1ц.	8		
62		"	морская звезда	23,6	1ц.	8-8,5		
		"	Речной рак <i>Astacus fluviatilis</i>	25	1ц.,с.	8		
63		"	Насекомые: шершень <i>Vespa orientalis</i>	17	1ц.,с.	7-8		[284,311]
64		"	бабочка <i>Pieris brassica</i>	32	1ц.	7-8		[284]
65		"	пчела <i>Apis mellifera</i>	20	1ц.	7-8		[284]
66		"	саранча <i>Locusta migratoria</i>	17	1ц.	7-8		[284]
67		"	табачный червь <i>Manduca sexta</i>	24	1ц.	7-8		
68			шелкопряд <i>Bombyx mori</i>	28	1ц.,гл.,с.	7-8	"Коконаза"	[312]
69	3.4.21.5	Тромбин	Плазма крови человека	40	2ц.,гл.,с.	7-8		[313,314-316]
70		"	быка	39	2ц. (32;5,7) гл.,с.	7-8	3 формы	[313,317-319]
71		"	свиньи	40	2ц.,гл.,с.	7-8	Фактор	[320-322, 323]
72	3.4.21.6	Фактор коагуляции Ха	Плазма крови человека	59	2ц. (42,17) гл.,с.	7-8	Страрга	[322]
73		То же	быка	56	2ц. (39,17) гл.,с.			
74	3.4.21.7	Плазмин	Плазма крови человека	76	2ц. (26,49) гл.,с.	7-8		[324,325-327]
75		"	быка и др.	80	2ц.,с.	7-8		[326,328]

76	3.4.21.9	Энтеропептидаза	12-перстная кишка человека быка	около 300 150	3 ц., гл. 2 ц. (115,35) гл.	8-9 8,4	Энтерокиназа	[329] [330,331]
78	"	"	свины	190	2 ц., гл.			[332]
79	3.4.21.10	Акрозин	Сперма человека и др.	38	1 ц., гл., с.	8-8,2	Активиро- ванный Са	[333-335]
80	"	"	медведя	41	2 ц. (37;4,2) гл., с.	8,5-9		[336]
81	"	"	асидии	32-34	гл., с.	8,5		[307]
82	3.4.21.12	α-Литическая протеиназа	<i>Lysobacter enzymogenus</i>	19,7	1 ц., с.	8		[337,338]
83	3.4.21.- 3.4.21.14	Литическая протеиназа Микрообные сериновые протеиназы	<i>Bacillus subtilis</i>	28	1 ц.	7,8-8,5		[339]
84		Субтилизин Карлсберг	<i>Bacillus licheniformis</i>	25,3	1 ц., с.	10-11	Субтилопеп- тидаза А	[340-343]
85		Субтилизин Е	<i>Bacillus subtilis</i>	27,7	1 ц., с.	8-10		[344,345]
86		Субтилизин ВРN'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	27,5	1 ц., с.	8,5-9,5	Субтилопеп- тидаза С, нагарсе	[342,343, 346-348]
87		Субтилизин DY	<i>Bacillus subtilis</i> DY	27,5	1 ц., с.	7-9		[349]
88		Протеиназа	То же	28,8	(2×14)	7-9		[350]
89		Внутриклеточная протеиназа	"	30	1 ц., с., диме- ризованная	7-9	Са-зависимая	[351,352]
90		Протеаза I	<i>Escherichia coli</i>	21	1 ц.	7-9	Периплазма	[353,354]
91	"	"	То же	58	1 ц., гл.	7-9	Цитоплазма	[355,356]
92	"	"	"	34	1 ц., с.	7,5	Сигнальная, Наружная, мембранная	[357,358, 359]
93	"	"	"	(67)	(тетрамер)	7-7,2	Трансмемб- ранная	[360]
94	"	"	"	43	Ассоцииро- ванная с SDS	7,8	Мембранная	[359]
95	"	"	"	180	в SDS, с.	6	Продукт отщеп. гена	[361]
96	"	"	"	140	(2×70)	6,5	Цитоплазма	[362,363]
97	"	"	"	82	1 ц.	8	Периплазма и цитоплазма	[362]
98	"	"	"	110			Периплазма	[362]
99	"	"	"	110			Цитоплазма	[362]
100		Щелочные протеиназы А	<i>Bacillus mesentericus</i>	24	1 ц., с.	7-9	Мезентерико- пептидаза	[364]
101		То же В	<i>Aspergillus oryzae</i>	17,7	1 ц., гл.	10,5	Аспергилло-	[365,366]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
102	"	C	То же	19,6	1 ц., гл.	10,5	Пептидаза B	[365]
103	"	"	<i>Aspergillus flavus</i>	18	1 ц.	7-10	То же C	[365, 367]
104	"	"	<i>Streptomyces griseus</i>	25,7	1 ц.	7-10		[365, 366]
105	Протеиназы комплекса "проназа"							
106	То же	A	То же	18	1 ц., с.	8-10		[368, 369, 370]
107	"	B	"	20	1 ц., с.	8-10		[368, 369, 371]
108	"	C	"	16-18	1 ц.	8-10		[368, 369]
109	"	D	"	27	1 ц.	8-10		[372]
110	"	E	"	27	1 ц.	8-10		[372]
111	Внеклеточная протеиназа A		<i>Streptomyces rutzgensensis</i>	20	1 ц., с.	9-10		[373]
112	То же D		То же	28	1 ц.	8-10	Na-зависимая 2 формы	[374]
113	Протеиназа SSPB		<i>Streptomyces spheroides</i>	28		10-11	Фибринолитическая	[375]
114	Протеиназа K		<i>Arthrobacter</i> sp.	23	1 ц.	6-9		[376, 377]
115	"		<i>Tritirachium album</i>	29	1 ц., с.	8		[378, 379, 380]
116	Термомиколлин		Гриб <i>Malbranchea pulchella</i>	33	1 ц., с.	8,5	Ca-зависимая	[381]
117	Термостабильная протеиназа		<i>Thermotoga</i> sp.	14,5		9	t _{опт} 80°С	[382]
118	То же		<i>Thermus caldophilus</i>	75	гл.	7,2-7,8	При денатурации 7 форм (M _r 31-62)	[383]
119	Аквализин I		<i>Thermus aquaticus</i>	28,5	1 ц.	10	Эластазопо-добная (автолиз)	[384, 385, 386]
120	Бациллопептидаза F		<i>Bacillus subtilis</i>	33,5	1 ц., гл., с.	7,5-8	2 формы	[387]
121	Протеиназа		<i>Flavobacterium arborisens</i>	19		8-10,5		[388]
122	Кутиккуло-деградирующая протеиназа Pt-1		<i>Metarhizium anisopliae</i>	25	1 ц.			[389]
123	То же Pt-2		То же	28,5	1 ц.			[389]
124	Протеиназа		<i>Tritichorphyton rubrum</i>	90	(2×44)	8	Активируемая Са	[390]
125	" архебактерий		<i>Desulfurococcus</i> sp.	52	M _r 13 (метод гель-фильт-		Сохраняет активность	[391]

125	"	цианобактерий	<i>Anabaena variabilis</i>	52	рации)	при 125°C!	[392]
126	"		<i>Lactococcus lactis</i>	135	1ц., с.	Са-зависимая В оболочке клеток	[393]
127	Термигала		<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	35	1ц., с.	Ингибируется Hg	[394, 395, 396]
128	Протеиназа	α	<i>Alternaria fennelliae</i>	24	1ц.		[397]
129	3.4.21.16 3.4.21.18		Хрущак мучной <i>Tenebrio molitor</i>	24	1ц.		[398]
130	"	β	То же	60			[398]
131	"		Личинки <i>Nuroderma lineatum</i>	27	1ц., с.	Гиподермин А	[399]
132	"		То же	23	1ц., с.	Гиподермин В	[400]
133	Стафилококковая сериновая протеиназа	α	<i>Staphylococcus aureus</i>	29	1ц., с.	Glu-специфич- еская	[401, 402, 403, 404]
134	То же		То же	12	1ц.	Продукт ав- толлиза "В" ?	[401, 405]
135	Glu, Asp-специфичная протеиназа		<i>Streptomyces griseus</i>	20	1ц.		[406]
136	То же		<i>Streptomyces thermophilus</i>	25	1ц., с.		[407, 408]
137	Протеиназа I		<i>Aspergillus chrysogenum</i>	28	1ц., с.	Ингибируется Hg	[409]
138	Протеиназа		Подсолнечник	25	1ц.	То же	[410]
139	Катепсин G		Гранулоциты человека	28	1ц., с.		[411, 412]
140	То же		Лейкоциты животных	28	1ц.		[413, 414]
141	"		Нейтрофилы свиньи	28-29	1ц.		[415]
142	Фактор коагуляции VIIa		Плазма крови быка	53	2ц. (24, 29) гд., с.		[416, 417, 418]
143	То же	IXa	Плазма крови человека	44	2ц. (27, 17)	Кристалмас	[323, 419, 420]
144	"	Va	То же	170	гд., с. 2ц. (94, 74) гд., с.	Фактор субединицы связаны Са- мостиком	[421, 422, 423]
145	3.4.21.-	VIIa	"	160	2ц. (90, 69) гд., с.	Фактор Виллебранда	[424, 425, 426-428]
146	3.4.21.-	Белок C	" и быка	62	3ц. (40, 21, 2) гд., с.	Са- и липид- зависимый	[429, 430, 431]
147	3.4.21.-	Фактор C	Генатоциты краба	123	3ц. (80, 34, 8) с.		[432, 433]
148	3.4.21.23	Протеиназа змеи	<i>Vipera russelli</i>	124	(2×60)	Са-зависимая	[434]
149	3.4.21.24	Нейтральная протеиназа	Эритроциты барана	340	(6×60)	Аллотери- ческий фермент	[435]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
150	3.4.21.25	Кукумизин	Дня <i>Susim's molo</i>	50	1ц., гл.	9-11		[436]
151	3.4.21.26	Постпролиновая эндонепидаза	Плазма человека	130	(2 субеди- нищ), гл.	6		[437]
152	"	То же	То же	62		6-7		[437]
153	"	"	Органы крыс и др. Мозг быка и др.	68-74 74-77	1ц.	6-7,5 7	Ингибируется PCMB	[438-440] [441-445]
154	"	"	Морковь	75		7,3		[446]
155	"	"	Базидиомцеты	76		6,8		[447]
156	"	"	<i>Flaobacterium meningosepticum</i>	74	1ц.	7		[448]
157	3.4.21.27	Фактор коагуляции XIa	Плазма крови человека	130	2ц. (55,55) гл., с.	7,5	Антигемо- фильный фактор "Анкорд"	[449]
158	3.4.21.28	Протеиназа змеи	<i>Akistrotodon rhodostoma</i>	34	1ц., гл.	8,5		[450]
159	3.4.21.-	То же	" <i>contortrix</i>	37	1ц., с.	8	"Батрахобин"	[451, 452]
160	3.4.21.29	"	<i>Botrops atrox</i> I	29	1ц., гл., с.	7,4		[453, 454]
161	3.4.21.30	"	" II	31,4		7,4		[453]
162	"	"	<i>Crotalus adamanteus</i>	33,2	1ц., гл., с.	8	"Кротоза"	[455, 456]
	"	"	" <i>atrox</i> II	31	1ц., гл., с.	7	Фибриноге- наза 2	[457-459]
163	"	"	То же III	24	(2×13)	7		[457-459]
164	3.4.21.-	"	<i>Crotalus hortius</i>	29,5	1ц., гл.		"Флавоско- син"	[460]
165	3.4.21.31	Активатор пламиногена	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	23,5	1ц., с.	8,5		[461, 462]
166	"	"	Почки, моча человека и др.	31 и 55	1 или 2 ц., с.	7,5	Урокиназа, несколько форм	[463, 464, 465, 466, 467]
167	"	То же	Ткани человека и др.	67	1ц., с.		Тканевый активатор	[463, 468]
168	3.4.21.32	Коллагенолитическая протеиназа	Фибробласты человека Крaб <i>Uca pugnator</i>	52 25,5	2ц. (39,19) 1ц., с.	7,5 8		[469]
169	3.4.21.33	То же	Гриб <i>Entomophthora coronata</i>	23	1ц.	7,2		[470, 471, 472]
170	"	"	Крaб <i>Paralithodes camtschatto</i>	27	1ц.	7,9	3 изоформы	[473, 474] [475]
171	"	"	<i>Parasilus asotus</i>	29,5	1ц.	7,5		[476]
172	3.4.21.34	Калликреин плазмы	Плазма крови человека	87	3ц. (34,28, 22), гл., с.	7,6	2 формы	[477-482, 483]
173	"	То же	То же быка	95	2ц.	8,8		[484]
174	"	"	" свиный	88	1ц.	8		[485]
175	3.4.21.35	Калликреин тканевый	Поджелудочная железа и	35	1ц., гл., с.	7		[486]

176	То же		Поджелудочная железа собак	27	1 ц., гл., с.	7	[487]
177	"		То же	30	1 ц., гл., с.		[488, 489]
178	"		Подчелюстная железа мышей	29	1 ц., гл., с.		[490, 491]
179	Семинин		Семенная плазма человека, собак	26	1 ц., гл., с.	7-8	[492, 493]
180	Эластаза I	панкреатическая	Поджелудочная железа человека и др.	26-28	1 ц., гл., с.	8-10	[494, 495, 496-498, 499]
181	Эластаза II и III		То же	25	1 ц., гл., с.	8-10	[299, 499- 501]
182	Протеаза E		"	31	1 ц., с.	8	[502-504, 505, 506]
183	Эластаза лейкоцитарная		Лейкоциты человека	30	1 ц., с.	8-10	[507, 508, 509, 510]
184	Медулазин		Костный мозг человека	32	1 ц., с.	8,5	[511, 512, 513]
185	Эластолитическая протеиназа		<i>Schistosoma mansoni</i>	30	1 ц., с.	9	[514, 515]
186	Фактор коагуляции XIIa		Плазма крови человека и др.	77	2 ц. (48,28) гл., с.	7,4	[417, 516, 517, 518, 519]
187	Хилаза I		Тучные клетки человека и др.	30			[520]
	То же		То же	26	1 ц., с.	8,6-9	[521-523, 524, 525]
188	" II		Атипичные тучные клетки	25	1 ц., с.	8,6-9	[521, 522, 526, 528]
189	Триптаза		Мыши Тучные клетки легких человека	144	2 ц. (2×37,2×35) гл.		[527, 529]
190	То же		Другие ткани человека и животных	110- 120	(4×30-36) гл., с.		[530, 531, 532]
	Гранзимы A		Цитотоксичные T-лимфоциты человека, мыши	60	(2×35) с.	8-8,5	[533-537, 538-541]
191	То же		То же	29	1 ц., с.		[533-537, 538-541]
192	"	B(G,H) D,E,F	"	35-50	1 ц., с.	8	[542]
193	Мемзин		Клетки саркомы Уокера	32,5	1 ц.		[543, 544]
194	Алипсин		Алипоциты	28	1 ц., с.		[545-549]
195	Протеиназа A		Подчелюстная железа	30	1 ц., с.	9,3	[545-549]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
196		То же	Мышей	30,5	1ц., с.	8	пептидаза	[545-549, 550]
197		"	То же	28	1ц., с.	8		[550, 551, 552]
198	3.4.21.-	Тонин	"	30	1ц., с.	6-7		[548]
199	3.4.21.-	Протеаза RSP-V	"	25	2ц. (19,5;6)	около 10		[553-555, 556, 557]
200	3.4.21.41	Фактор C1г системы комплемента	Плазма крови человека	170	2ц. (56,27) (димер), гл., с.	7		[558, 559, 560, 561]
201	3.4.21.42	Фактор C1s системы комплемента	То же	83	2ц. (56,27) гл., с.	7,6	Факторы C4b и C2b,	[550, 555, 559, 562]
202	3.4.21.43	Классическая C3/C5 конвертаза	"	280	2ц. (75,35) гл., с.	7	Mg-зависимая C3b-инактиватор	[563, 564]
203	3.4.21.45	Фактор комплемента 1	"	88	2ц. (50,38) гл., с.	7	Активируется C3b и Mg	[555, 565]
204	3.4.21.46	Фактор D альтернативной системы комплемента	"	24	1ц., с.	7	Факторы C3b и Bb,	[553, 566-570]
205	3.4.21.47	Альтернативная C3/C5 конвертаза	"	223	2ц. (63,160)	7	Mg-зависимая Ингибируется	[571, 572, 573, 574]
206	3.4.21.48	Протеиназа B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32	1ц., гл., с.	6,5-7	То же	[575, 576-578]
207		То же	<i>Candida albicans</i>	30	1ц., гл.	6	Сходна с	[579]
208	3.4.21.-	"	Инсулинома человека	66	гл., с.		УСC F(№ 210)	[580]
209	3.4.21.-	"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130	1ц., гл., с.	5,5	Кодируется КЕХ-2 геном в [10в]-	[581-583, 584]
210	3.4.21.49	Коллагенолитическая протеиназа	<i>Hypoderma lineatum</i>	25	1ц., с.		-3.4.22.23	[585, 586]
211	3.4.21.50	Протеиназа I	<i>Aerobobacter lyticus</i>	27	1ц., с.	8-9	Lys-специфическая	[587, 588, 589]
212		То же	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	1ц.	8-9	То же	[590]
213	3.4.21.51	Нейтральная протеиназа	Мембрана лейкоцитов	75		7,4	Мембранная	[591]
214	3.4.21.52	Катапсин R	Риосомы печени крыс	25-30	1ц.	7	То же	[592-594]
215	3.4.21.-	Протеаза кортикальных гранул	Яйца морского ежа	47	1ц.	8	Активируемая Са	[595, 596]
216	3.4.21.-	Фермент "выщелачивания" (Hatching enzyme)	<i>Xenopus laevis</i>	(23?) 62		7,7	Ср. 3.4.24.12	[597]

217	3.4.21.-	То же	<i>Parascentrotus lilioides</i>	52	гл.	8	То же	[598]
218	3.4.21.-	Триаза	Печень крыс	32,5	1ц.	7,5	Имеет	[599]
219	3.4.21.53	Протеаза Ia	<i>Escherichia coli</i>	360	(4×87), с.	7-8	АТР-азную активность	[600-602, 603, 604]
220	3.4.21.-	" Ti	То же	340	2ц. (80, 12×23) с.	7-8	То же	[605, 606, 607]
221	3.4.21.-	" Do	"	520	с.	6-8,5	"Ингенсин".	[362, 608]
222	3.4.21.-	Мультикаталитическая протеиназа	Ретикулоциты животных и бактерии	700- 900	(около 20× ×25-30), с.	7-9	Образует "протеосомы"	[609-613, 614-616]
223	3.4.21.-	АТР-зависимая протеиназа	Митохондрии крыс и др.	около 600		8-9	Ингибируется PCMB, ср. 333	[617-619]
224	3.4.21.-	Убикитин	Повсеместно у эукариот	8,5	1ц.	8	Ванадатом Компонент АТР-зависимой системы протеолиза	[620]
225	3.4.21.54	γ-Ренин	Подчелюстная железа мышей	26	(в восстанови- тельных условиях M _r 7,4 и 4,4, с.	8		[621]
226	3.4.21.55	Габоназа	<i>Bitis gabonica</i>	30,6	1ц., гл., с.	6-8		[622]
227	3.4.21.56	Эуфорбин d1	Латекс <i>Euphorbia lathyrus</i>	117	(42×30)	7		[623, 624]
228		" d2	"	65 (43)	(22×30)			[623]
229	3.4.21.57	Лейцин специфическая протеиназа	Листья шпината					[625]
230	3.4.21.58	Прогормональная сериновая протеиназа	Гипофиз, печень	около 170	2ц. (2×38,50) с.	8,5	IGCM-I (генсин)	[626, 627, 628]
231	3.4.21.-	Протеаза процессинга	Плазма крови крыс	38	1ц.	7	Расщепляет про-ANF	[629]
232		То же	Тонкий кишечник крыс	33	1ц.	7,5	Расщепляет изоцитратде- гидрогеназу и др.	[630]
233		"	То же	55		7,5	Расщепляет просомато- статин	[631]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
234		"	Нейробластома	28	1ц.	8,5	Расщепляет динорфин	[632]
235		"	Цереброспинальная жидкость человека	40		6-8	То же	[633]
236		"	Эритроциты человека	57	1ц.	7,2	Расщепляет ОЗ фактор	[634]
237		"	Водоросли	46	1ц.	6	Активирует комплемента	[635]
238	3.4.21.-	Протеиназа хроматина	I II Печень крыс То же Поджелудочная железа То же	18	1ц.	10	Активирует галактозил- трансферазу	[636, 637]
239		То же		27	1ц.	8		[636, 637]
240	3.4.21.-	Эндопептидаза фактора роста нервов (ФРН)		26	1ц., с.	6	γ-Сульфидини- ца ФРН	[638, 639]
241	3.4.21.-	Связывающий белок фактора роста эпидермиса		29	1ц., гл., с.	8		[640, 641]
242	3.4.21.-	Эластазо-подобная протеиназа	Кровяные бляшки	26	1ц.	7	Латентная форма M ₂₈	[642]
243	3.4.21.-	Протеиназа хемотаксиса	Кожа человека	30	1ц.	7,8	Сходна с химазой 1	[643]
244	3.4.21.-	Протеиназа	Лямбда легких овец <i>Escherichia coli</i>	70-75 37	1ц., с.	7,5 8	Не ингибиру- ется RMR	[644] [645, 646]
245	3.4.21.-	Сигнальная пептидаза						
			Эукариоты	21	1ц., с.		Комплексы; 5 белков	[647]
246	3.4.21.-	Липопротеин-сигнальная пептидаза	<i>Escherichia coli</i>	18	1ц., с.			[648, 649]
247	3.4.21.-	Rec A протеиназа	То же	40	1ц., с.		АТР-зависимы- тип III	[650, 651, 652]
248	3.4.21.-	Протеиназы вирусов	Аденовирус (тип 2) Соеммовирус Лютховирус Альфовирус	19	1ц., с.	7		[653, 654]
249		То же		22	1ц., с.			[655, 656]
250		"		22	1ц., с.			[656]
251		"		26	1ц., с.		Гидролизует структурные белки	[657]
252	3.5.1.1	Аспарагиназа	Морская свинка Бактерии	135	(4×35)	8		[658]
253		"		120- -140	(4×32-35) с.	7-8	У <i>Escherichia coli</i> 2 формы	[659, 660, 661-663]
254		"	Дрожжи	400		8,5	Димер (?)	[664, 665]

255	3.5.1.11	Пенициллинамидаза	70	(3-4×20)	7-9	2 формы	[666-668] [669-671, 672-675] [676]
256	3.5.2.6	β-Лактамаза I	28-32	1ц., с.	7-8		
257	3.5.2.-	Цефалоспориназа амп C	39,6	1ц., с.			
Цистеиновые амидгидролазы							
258	3.4.11.5	Пролин-иминопептидаза	58	1ц.	7		[677]
259		То же	40	1ц.	7,3		[678]
260		"	220	(4×55)	7,5-8		[679]
261	3.4.11.6	Аргинин-аминопептидаза	72	1ц.	6,5	Аминопепти- даза B; активиру- ется Cl, 2 формы	[680]
262		То же	95	(4×25)	7	То же, акти- вен димер	[681]
263		"	58	1ц.	7,5	То же	[682]
264	3.4.11.-	"	62	1ц.	8,6	Инигиру- ется Cl	[683]
265	3.4.11.-	Блеомин-гидролаза	360	(5×50), с.	7,6		[683]
266	3.4.11.-	Аминопептидаза	250	(4×14)	7,4		[684]
267	3.4.11.-	То же	56		7		[685]
		I	68		7,6		[686]
		II	72		7,6		[686]
268	3.4.13.9	Пролин-дипептидаза	54	димер (?)	8	Пролидаза	[687]
269		"	около	гл. с.	8	Мп-зависимая	[688]
270		"	150	(2×56)	7,2		[689]
271		"	116	2ц. (64,68)	8		[690]
272	3.4.13.10	β-Аспаргилдипептидаза	132		7,5	Активируется NaCl	[691,692] [693]
		"	120		7,4-8		
273	3.4.13.-	Лизосомная дипептидаза	120	(8×25)	4,5	Катепсин C	[694]
274	3.4.14.1	Дипептилдипептидаза	210	гл. с. (в SDS)	6		[695,696]
		II					
		I					
		V	64		7	Активируется	[697]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
275	3.4.16.3	Лизосомная тирозин- карбоксипептидаза	Щитовидная железа свиный			4,1	Мп В К.Ф. - се- риновая	[698]
276	3.4.17.8	Мураомилпентапептид карбоксипептидаза	<i>Escherichia coli</i>	65	(2×32)	7-8	Три формы: А, В, С	[699]
277	3.4.18.1	Лизосомная карбоксипептидаза N	Селезенка быка и др.	52	(2×25) гл.	5	Катепсин В2	[700-702]
278	3.4.19.3	5-Оксипролил-пептидаза "	Печень, мозг быка и др. <i>Pseudomonas fluorescens</i> и др.	24-33 70-80	1ц. (3×24)	6-8 7-8	Пироглута- миллепти- даза 1	[703, 704] [705-709]
279	3.4.22.1	Катепсин В (В1)	Печень человека	24	2ц. (22,5;5) гл., с.	6	Обладает ак- золепти- дазной ак- тивностью	[709, 710- 712]
280		То же	Лизосомы животных	25-29	2ц. (23-25;5) гл., с.	6-7	То же	[713-719, 720-723]
281		"	Печень кур	30	2ц. (25,5)			[724]
282	3.4.22.-	Протеиназа	Опухоли мышей	33	1ц.	5,5-7	Латентная форма, M _r 40	[716, 719]
283	3.4.22.2	Папаин	Дынное дерево <i>Carica papaya</i>	23,4	1ц., с.	6		[725, 726]
284	3.4.22.3	Фитин	Латекс <i>Ficus glabrata</i> и др.	23,8	1ц., гл., с.	6,5-9,5		[727, 728, 729]
285	3.4.22.4	Бромелаин	Ананас, плоды " ствол	18 35	1ц. 1ц., гл., с.	8,3 5-6		[730] [730, 731, 732]
3.4.22.-		Калотропин	Латекс <i>Calotropis gigantea</i>	24	1ц.	7,8-8	Несколько форм	[733]
286	3.4.22.-	Анагин	То же	25	1ц., с.	6,8		[734]
287	3.4.22.6	Химопаин А	Дынное дерево	25	1ц., с.	7,2		[735, 736- 738]
288		"	То же	28 (35,5)	1ц.	6-7		[736-738]
289		"	"	24,7	1ц.	6-7		[739]
290	3.4.22.-	Пептидаза	"	24	1ц., с.	5-8	Протеиназа α	[736, 738, 740, 741]
291		"	"	20,7	1ц.	6	" III	[736, 738, 740]
292	3.4.22.-	Протеиназа	"	24,5	1ц.	7	Активируется Ca	[742]
293	3.4.22.8	Клострипаин	<i>Clostridium histolyticum</i>	55,5	2ц. (43;12,5) с.	7-7,2		[743, 744]
294	3.4.22.10	Стрептококковая	<i>Streptococcus</i> sp.	32	1ц., с.	7-8		[745, 746]

295	3.4.22.12	протеиназа γ-Глутамил-гидролаза	Печень быка и др.	108	1ц., гл.	4,5	Карбоксипеп- тидаза G	747] [748]
296		То же	Тонкий кишечник крыс	80	1ц.	4,5		[749,750]
297	3.4.22.13	Стафилококковая	<i>Staphylococcus aureus</i> V8	12,5	1ц., с.	8,8	Протеин- аза II	[405]
298	3.4.22.14	Цистеиновая протеиназа	Крыжовник <i>Actinidia chinensis</i>	26	1ц., с.	5-6,5		[751,752]
299	3.4.22.15	Катепсин I	Печень человека	30	2ц. (25,5)	6-7	Множествен- ные формы	[753,754]
300		То же	Лизосомы печени крыс	23-24	1ц., с.	6-7	То же	[755-758, 759-761] [762]
301	3.4.22.-	Гемоглобин-гидролизирующая протеиназа	Печень человека и др.	20	1ц.	3,5		[721,763- 765]
302	3.4.22.16	Катепсин H	Лизосомы человека, крыс	28	1ц., гл., с.	5,5-6,8	2 формы	[766-770, 772,773]
303	3.4.22.17	Калпаин I	Разные ткани животных	120	2ц. (80,30) с.	7,5-8	Активен при микромоль- ных концен- трациях 0а	[766-770, 772,773]
304		" II	То же	120	2ц. (80,30) с.	7,6	Активен при миллимоляр- ных концен- трациях 0а	[766-770, 772,773]
305		" III	"	78-94	(94 по кДНК) с.	7,2	Активен при миллимоляр- ных концен- трациях 0а	[771,774]
306	3.4.22.18	Пролил-эндопептидаза	Плацента человека	140	(2×67)	6,7		[775]
307		То же	Адреногипофиз	70		7,5		[776]
308	3.4.22.19	Проэнкефалин-превращающий фермент	Надпочечники быка	220		5,5		[777]
309	3.4.22.20	Динорфин-превращающий фермент	Мозг крыс			8	Мембранный	[778]
310	3.4.22.21	Протеиназа урс E	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	около 600	(?×70)	8,5		[779]
311	3.4.22.22	"	То же	83				[780]
312	3.4.22.-	"	Макрофаги мыши	21	1ц., с.	6,5-7	Сходна с ка- тепсином H	[781]
313	3.4.22.-	Катепсин N	Плацента человека	34,6	1ц.	3,5	Коллагено- литический катепсин	[757,782, 783]
314	3.4.22.-	" S	Селезенка быка	23-25	1ц.	4-6		[757,759, 784,785]
315	3.4.22.24	" T	Почки крыс	33-35	1ц.	5,8-6,5		[786,787]
316	3.4.22.-	" J	Ткани человека	230		6,2-6,8		[788]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
317	3.4.22.-	" К	То же	650	1ц., с.	6,2-6,8		[788]
318	3.4.22.-	Алеураин	Ячмень	37				[789]
319	3.4.22.-	Протеиназа I	Шелкопряд	160		3,5		[790]
320	3.4.22.-	" II	"	68		3,5		[790]
321	3.4.22.-	Лейкогрозин-генерирующий фермент	Кожа кролика (ожог)	14	Агрегирован	7,1		[791]
322	3.4.22.-	Цитозольная инсулин-глюкагоновая протеиназа	Ткани крыс	80		7,5	Инсулиназа	[792, 793]
323	3.4.22.-	Протеиназа	Карцинома кролика	68	гл.	6,5	Активирует фактор X	[794]
324	3.4.22.-	"	Кожа <i>Xenopus laevis</i>	30	1ц.	5-6	Расщепляет IgG	[795]
325	3.4.22.-	Протеаза	<i>Serratia marcescens</i>	73		7,5-8		[796]
326	3.4.22.-	Протеиназа I	<i>Ditycostellum discoidium</i>	36	1ц., гл., с.	4,5	Содержит Р	[797, 798]
327	3.4.22.-	Щелочная протеиназа	<i>Microrogon opercularis</i>	363		9,1	t _{opt} 60°C	[799]
328	3.4.22.-	Эндопептидаза тканевая	Митохондрии животных	56-95	1ц.	7	"PZ"-пептидаза; возможна но идентична 3.4.22.19	[800-804]
329	3.4.22.-	Нейтральная эндопептидаза	Цитозоль гифофиза	>100		7-7,5	Катиончувствительная	[805]
330	3.4.22.-	Гидролаза H	Мышцы кролика	340	(4×51,72,92) 3ц. α ₄ βγ	7,5-8	Аминоводно-пептидаза	[806]
331	3.4.22.-	Преренин-процессинговая протеаза	Почки человека	27	1ц.	4,8-5,6		[807]
332	3.4.22.-	Макропаин	Ретикулоциты и др.	около 600	(3×30)	7,6-9,8	Вероятно, идентичен мультикаталитической протеазе (см. № 222)	[808-812]
333	3.4.22.-	АТФ-зависимая протеаза	То же	около 600			Ср. № 224	[813, 814]
334	3.4.22.-	Протеазы вирусов	Комовирусы	24	1ц., с.			[654, 656, 815, 816]
335		То же	Пикорнавирусы	22	1ц., с.			[654, 816, 817]
336		"	"	17	1ц., с.			[656, 818]
337		"	Неповирусы	22	1ц., с.			[654, 656]
338		"	Альфавирусы	26	1ц., с.			[819]
339	3.5.1.14	Аминоацилаза	Почки свиньи	86	(2×43)	8-9	Ацилаза I.	[820, 821]

340	3.5.1.30	5-Аминовалерил-амидаза	<i>Pseudomonas putida</i>	67	1ц.	7,5-8,5	Дегидропеп- тидаза II	[822]
341	3.5.1.31	Формилметионин- деформилаза	Тонкий кишечник крыс и др.	около 50		8-9		[823]
342	3.5.1.42	Никотинамиднуклеотид- деаминаза	<i>Agrobacterium vitae landii</i>	26		6,5-7		[824]
343	3.5.1.43	Пептидил-глутаминаза	<i>Bacillus citricolans</i>	90		8	Пептидоглу- таминаза I	[825]
344	3.5.1.44	Глутаминилпептид- глутаминаза	То же	125		7,5	То же II	[825]
345	3.5.1.55	Ацетилглутамат-деацетилаза	<i>Pseudomonas diminuta</i>	300		8	Гидролизует длинные	[826]
346		"	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	40-48		5,7	почечные ацилпроиз- водные	[827]
347	3.5.1.60	Апиглетаноламин-деацетилаза	Печень крыс			9	Активируется Mn	[828]
348	3.5.1.-	Аскаминил-гидролизующая амидаза	<i>Xanthomonas citri</i>	38		7,5-8		[829]
Аспартатные амидгидролазы								
349	3.4.23.1	Пепсин А	Желудок человека	34	1ц., с.	1,9	4 формы	[830, 831, 832, 833]
350		То же	То же др. млекопитающие	34-42	1ц., с.	2-4	Множествен- ные формы	[830, 834- 836, 837- 840]
351		"	" акулы	35	1ц.	2-4	3 формы	[842]
352		"	" курицы	35	1ц., тл., с.	2-3		[843, 844, 845]
353	3.4.23.2	" В	" свиньи	38,6	1ц.	2-4	Желатиназа, 1 парапепсин	[834]
354	3.4.23.3	" С	" человека	31	1ц., с.	2-3	Гастрин	[846]
355		То же	" свиньи и др.	32	1ц., с.	3		[847, 848, 849]
356	3.4.23.-	Уропепсин	Моча человека	33		2	2 формы	[849]
357	3.4.23.4	Химозин А и В	Теленок	30,5	1ц., с.	3,5	"Реннин"	[850, 851]
358		" С	То же	30,5	2ц., с.			[852]
359		То же	Кошка	около 30	1ц., с.	2,5		[853]
360	3.4.23.5	Катепсин D	Лизосомы человека	42	2ц. (27, 14)	4,5-5	3 формы	[854, 855]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
361		То же	Разные органы млекопитающих	40-50	гл., с. 1 ц. [селезен- ке свиньи], 2 ц. (35, 15)	3-4, 5	Множествен- ные формы	[856-860, 861-863]
362		"	Яичники кролика	42	гл., с. (2×20)	3, 8	5 изоформ	[864] [865]
363		"	Надпочечники свиньи	около 65	3 ц. (27, 24, 14) гл.			
364		"	Мышцы кур	36	1 ц. (2×42)	3, 5	"Медленный" катепсин	[866] [867-869]
365	3.4.23.-	Катепсин D-подобная протеиназа	Слизистая желудка человека и др.	86	(2×30)	3		[870]
366		"	Слизистая тонкого кишечника свиньи	60		3, 2		
367	3.4.23.-	Катепсин E	Нейтрофилы человека и животных	около 100	(2×50) гл., с.	2, 5-3, 2		[871-874, 875]
368	3.4.23.-	Семинальный пепсин	Сперма человека	35	1 ц.	3	В сперме - проформа	[876] [877]
369	3.4.23.-	Протеиназа	Матка свиньи	41	1 ц.	3, 5		
370	3.4.23.6	Аспартагные протеиназы микроорганизмов	<i>Aspergillus oryzae</i>	39, 4	1 ц., гл.	3, 2-3, 6	"Такадиас- таза"	[878, 879]
371		"	" <i>saltol</i>	34, 5	1 ц.	2, 7	Аспергилло- пептидаза	[880]
372		"	" <i>awamori</i>	35	1 ц., с.	2, 3-2, 6	Аваморин	[881, 882]
373		"	" <i>niger</i> <i>var macrosporum</i>	136	(2×60) гл.	3	Проктаза A, пептоатин не чувст- вительная	[883]
374		"	<i>Penicillium lanthiellum</i>	32	1 ц., с.	3-4	Пеницилло- пепсин	[884, 885]
375		"	" <i>roqueforti</i>	33, 4	1 ц., гл.	3, 5	Ризоус-	[886]
376		"	<i>Rhizopus oryzae</i>	35	1 ц., с.	2, 9-3, 3	пепсин, 3 изо- фермента	[887, 888- 890]
377		"	" <i>niveus</i>	35	1 ц., с.	3		[891]
378		"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45	1 ц., гл., с.	2, 4-3, 3	Протеиназа A	[892-894, 895]
379		"	<i>Candida albicans</i>	45	1 ц.	2-3, 9	Эндотига-	[896]
380		"	<i>Endothia parasitica</i>	34, 5	1 ц., с.	2, 5	пепсин	[897, 898]
381		"	<i>Mucor mitchellii</i>	38	1 ц., гл., с.	4		[899, 900]

382	"	"	<i>Pyrellus</i>	40	1 ц., гл., с.	около 5	[901, 902]
383	"	"	<i>Mycospora canthus</i>	45	1 ц.	2, 3-2, 8	[903]
384	"	"	<i>Trichoderma</i> sp.	32	1 ц.	2	[904]
385	"	"	<i>Sclerotium acidocaldarium</i>	45	1 ц., гл., с.		[905]
386	"	"	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	29, 3		5, 5	[906]
387	"	"	<i>Plasmodium berghei</i>	35	1 ц.	3-3, 6	[907]
388	Рисолин	"	Скорежка	43 (?)	1 ц., с.	2, 2	[908]
389	Протеаза В	"	<i>Seytaldium lignicolum</i>	62	гл., с.	3-3, 5	[909, 910, 911]
390	"Барьерная" протеиназа	"	<i>Saccharomycetes cerevisiae</i>	21	Димеризована		[912]
391	Тироидная аспартильная протеиназа	"	Щитовидная железа быка	70	гл.	3, 6	[913]
392	Проопиомеланокортин-превращающий фермент	"	Гипофиз быка	10-16	1 ц.	4-5	[914, 915]
393	Эндопептидаза миелина	"	Нервная ткань человека	36, 8	1 ц.	4	[916]
394	Аспартильная протеиназа	"	<i>Lepanthes, peltata</i>	80	1 ц.	2-3	[917]
395	насекомоядных растений	"	<i>Lotus</i>	27, 8	1 ц.		[918]
396	Аспартильная протеиназа	"	<i>Sorghum vulgare</i>	58	1 ц., (или 2 ц.)	3, 6	[919]
397	То же	"	Семена гречихи	37	гл., с.	3, 5	[920]
398	"	"	" пшеницы	36-44		4, 5	[921]
399	"	"	Томаты			2, 5-3, 5	[922]
400	Ренин	"	Почки человека и др.	36		Высокомолекулярная форма (около 65)-комплекс с ренином-связывающим белком	[923-928, 930-932]
401	"	"	Гипофиз быка	40	1 ц., с.	7	[927]
402	Протеиназа мембран эритроцитов (ЕМАР)	"	Поджелудочная железа мышей	80	1 ц.		[929]
403	То же	"	Эритроциты человека	40	1 ц.	2, 8-3, 9	[873, 933-936]
404	"	"	"	30	1 ц.	2, 8-3, 9	[873, 933-936]
405	"	"	" крыс	80-82		3, 5-4	[937]
406	γ-Глутамилтранспептидаза	"	Почки крыс	22	1 ц.	Активна до pH 9	[938]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
407	3.4.23.-	(легкая цепь) Аспартагные протеиназы						
408		ретровирусов						
409		То же	НIV-1	11	1ц., с.	5,5	Активен в виде димера	[939, 940- 942] [939, 943] [939, 944] [939, 945] [946] [947] [948, 949]
410		"	НIV-11		1ц., с.			
411		"	Лейкемии мышей	13,3	1ц., с.			
412		"	Лейкемии быка (BLV)	14	1ц., с.			
413	3.5.1.38	Глутамин (аспарагин) аза	Саркомы птиц	15	1ц., с.	7		
			<i>Achrostobacter</i> sp.	140	(4×35) с.			
Металлосодержащие амидгидролазы								
414	3.4.11.1	Цитозольная аминопеп- тидаза	Почки, печень и др. (бык, свинья и пр.)	270- 300	(4×64-66) с.	9-9,5	Лейцинамино- пептидаза, Zn, активи- руется Mg	[950-953]
415		То же	Хрусталик глаза быка	360	(6×54-60) с.	8,5-9	То же	[954, 955, 956]
416	3.4.11.-	"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	610	(12×51), с.	7-8,5		[957, 958]
417		"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	156	(4×40)	6-7	Zn	[959]
418	3.4.11.2	Микросомальная амино- пептидаза	Тонкий кишечник человека и др.	210- 280	(2×100-140) с.	8	Zn	[960-964, 965]
419		То же	Почки, печень человека и др.	235	(2×120)	8	Аминопептид- аза M(N)	[226, 966- 968, 969]
420		"	Мозг крыс, быка	115	гл., с.	6,5-7	Гидролизует энкефалин, Zn	[970, 971] [972, 973]
421		"	Скелетные мышцы человека и др.	100- 120		7,3	Mn, Димер и полимер	[974]
422		"	Фибробласты	150		7,3	Zn, оксито- циназа	[975, 976]
423	3.4.11.3	Цистил-аминопептидаза	Сыворотка крови человека	280	(2×140) гл.	7,3	Zn, Mn	[977, 978]
424	3.4.11.4	Трипептидаминопептидаза	Энтероциты и другие ткани животных	50-70	1ц., гл.	7,8	аминопептид- аза A,	[976, 979, 980]
425	3.4.11.7	Аспаргатаминопептидаза	Сыворотка крови человека	260	(2×130)	6,7-7,2	активиру- ется Ca	[962, 981,
426		То же	Почки свиньи	≈400	4ц. (155, 110, 110)	7,5	То же	

427	"	" кролика	170	90, 45), гл.	7	"	982]
428	"	быка	65	1ц. (2×33)	7	"	[983-985]
429	Аминопептидаза Р	Почки, тонкий кишечник свиньи	>1000	(2×33)	7, 8	Мембранная, Mn	[986] [987-989]
430	То же	<i>Escherichia coli</i>	200	(4×50), с.	8, 6	Mn	[990, 991]
431	Аминопептидаза	<i>Aeromonas proteolytica</i>	25-32	1ц.	7-10	Zn	[992-995]
432	"	и др.	25	1ц.	7, 5-10	Ca, 2 формы	[996, 997]
433	"	<i>Streptomyces griseus</i>	34	1ц., с.		Co, Пептидаза M	[998, 999]
434	"	<i>Salmonella typhimurium</i>	46, 5	1ц.		Zn, активиру- ется Co	[1000]
435	"	<i>Bacillus subtilis</i>	87	1ц., с.			[1001, 1002, 1003, 1004]
436	3.4.11.11	<i>Escherichia coli</i>	80-90		8	Mn, "пепти- даза а"	[1005]
437	"	Кровь человека	61, 5		7, 5	Co, "энкефа- линаза"	[1006, 1007]
438	"	Мозг человека	(в SDS)	2ц. (62, 66)	7-8	Zn,	[1008, 1009]
439	"	" крыс	около 100	1ц.	7, 2	Zn, раство- римая и мембранная	[1010]
440	3.4.11.12	быка	105				
441	Термофильная амино- пептидаза	<i>Bacillus</i>	400	(12×36, 5)	7	Co (?)	[1011]
442	То же	<i>stearothermophilica</i> I	46	(2×23)			[1011]
443	"	То же	47, 5	(2×24)	6, 9	Co, t _{опт} 65°C	[1012]
444	"	<i>Tetrasomyces dyarontii</i>	400		6, 4	Co, Mn	[1013]
445	"	<i>Streptomyces thermophilica</i>	62	Тетрамер	7, 5	Zn	[1014]
446	"	<i>Alteomonas proteolytica</i> I	450	Мономер	8, 2	Zn	[1014]
447	"	То же	88	(2×33)	9, 3	Zn, t _{опт} 70°C	[1015]
448	3.4.11.13	III	63		8, 6	Mn, Co	[1016]
449	Аминопептидаза	<i>Clostridium histolyticum</i>	340	(6×56)	9-11	Mn, Mg	[1017]
450	"	<i>Escherichia coli</i>	323	(6×52)	8	Zn	[1018- -1020]
451	3.4.11.14	Печень человека	360	2ц. (53, 65) гл.	6, 5-7	Co	[1021]
452	"	" свиньи	96	1ц.	6	Zn, Cu	[1022]
453	То же	Хрусталик глаза быка	96			Co	[1023]
454	Аминопептидаза Co	Дрожжи	около 100		7, 6	Mn, "карно-	[1024]
454	3.4.13.3	Почки свиньи	84	1ц.			

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
455	3.4.13.4	пептидаза То же	Мозг крыс	85	1ц.	7,8	зиназа"	[1025]
456	3.4.13.4	Аминоацил-лизин	То же			6,5	То же Mn, Mg	[1026]
457	3.4.13.5	дипептидаза	Ткани крыс					[1027]
458	3.4.13.6	Аминоацил-метилглутимидин	Почки свиньи				Mn	[1028]
459	3.4.13.7	дипептидаза	То же			7,3		
460	3.4.13.8	Цистеинил-глицин дипептидаза	"	300	Агрегирующая	8-7,5	Mn, пролиназа	[1029]
461	3.4.13.11	α-Глутамил-глутамат	Почки быка	100	1ц.	8,7	Mn	[1031]
462	3.4.13.11	Пропил дипептидаза	" человека	130	(2×60), гл.	8	Zn	[1032]
463		То же	" свиньи	87-93	(2×47)	7,6	Zn, Co	[1033]
464		Микросомальная	Легкие крыс	150	(2×80)	8		[1034]
465		дипептидаза	Асцитная опухоль мыши	85	1ц.	8,2	Zn	[1035]
466		"	<i>Bescherichia coli</i> B	100	(2×53)	8	Zn (2)	[1036]
467	3.4.13.-	"	Поджелудочная железа человека	135	(2×68)	9	Zn	[1037]
468	3.4.13.12	Дипептидаза	<i>Bescherichia coli</i> B	93-95	(2×45)	7,8-9	Mn, дипептидаза M	[1038]
469	3.4.13.13	Метионил-дипептидаза	Почки свиньи	57	1ц.	7,2	Co	[1039]
470	3.4.13.14	Гомокарнозиназа						[1040]
471	3.4.13.15	γ-Глутамилдипептидаза	Мозг крыс	89	1ц.	8,3-9,4	Mn	[1025]
472	3.4.13.16	N ² -β-Аланилarginин	Почки свиньи	130	1ц.	8	Zn, аминоклепидида W	[1041]
473	3.4.15.1	дипептидаза	Ткани и сыворотка крови человека	170	1ц., гл., с.	7,5	Zn, активированная Cl, ангиотензин превращающий фермент	[1042, 1043-1046]
474		Дипептидилкарбокси пептидаза I					То же	[1047-1051]
475		"	Почки, легкие быка и др.	180-190	1ц., гл., с.	7,5		[1052]
476	3.4.15.3	Дипептидилкарбокси пептидаза II	Семенная жидкость быка	460		8,3	Zn	[1053]
477	3.4.17.1	Карбоксипептидаза A	<i>Bescherichia coli</i>	97	1ц.	8,2	Co, Zn	
			Поджелудочная железа человека и др.	35	1ц., с.	7,5-8,5	Zn	[1054, 1055, 1057]

478	"	Скелетные мышцы крас	I	39,3	1ц.	7,5-8,5	Zn	[1058]
479	"	То же	II	37,8	1ц.		Zn	[1058]
480	Карбоксипептидаза B	Тучные клетки мышц		36	1ц., с.		Zn	[1056]
481	То же	Пожелудочная железа		34,2	1ц.	7	Zn, 2 формы	[1059]
		железа человека						
		То же быка и др.		34-37	1ц., с.	7,5	Zn	[1060, 1061, 1062]
482	Аргининкарбоксипептидаза (карбоксипептидаза N)	Плазма крови человека		280	2ц. (2×50, 2×90) гмл., с.	7,5	Zn, кинкина-за I	[1063, 1064, 1065, 1066]
483	Карбоксипептидаза	Моча человека		75,6 (в SDS)		7	Co	[1067]
484	Глицинкарбоксипептидаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				6-6,2	Zn, Co	[1068]
485	Аспартагкарбоксипептидаза	<i>Pseudomonas</i> sp.				6-9	Zn, Co (?)	[1069]
486	Аламинкарбоксипептидаза	Почвенные микроорганизмы				7-8	Zn	[1070]
487	Ацетилмурамоилаланин-карбоксипептидаза	<i>Bacillus subtilis</i>		90	(2×45)	7	Mn	[1071]
488	D-Аланин-карбокси-пептидаза	<i>sphaereticus</i>				7,5-8	Zn, Co	[1072]
489	Карбоксипептидаза S	<i>Streptomyces albus</i> G		22	1ц., с.	7,5	Zn	[1073, 1074]
490	"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		50	1ц., гмл., с.	5,5	Zn, Co	[1075]
		Мозг человека и др.		55	1ц., гмл.	5-6	Co	[1076-1078]
		Инсулин-секреторные гранулы		55 и 57				
491	"	Опухоль печени человека		62	1ц.	5-6	Zn	[1080]
492	"	Плациента человека		38	1ц., гмл., с.	7	Co	[1081]
		<i>Thermoactinomyces</i> sp.			1ц.	7-8	Zn, t _{опт} 70°C	[1082]
493	"	<i>Streptomyces griseus</i>		41,2	1ц., с.	7,6	Zn, Co (2)	[1083]
494	"	" <i>sphaeroides</i>		33	1ц.		Активиру-ется Са	[1084]
495	"	Почки свиньи I		135	1ц.		Zn, Mn	[1085]
		То же II		230			Zn, Mn	[1085]
496	"	Речной рак		35-36	2ц. (128, 95) 1ц., с.	6,5	Zn	[1086]
		<i>Astacus fluviatilis</i>						
497	Пироглутамилпептидаза II	Мозг морских свинок		230			Гидролизует тирозин	[1087]
498	Металлопротеиназа	<i>Crotalus atrox</i> I		20	1ц.	7	Zn	[459]
499	"	То же IV		46	1ц., гмл.	7	Zn	[459]
500	"	" "е"		25,7	1ц., гмл., с.	8-9	Zn, токсин "е"	[1088-1090]
501	"	<i>Crotalus horridus horridus</i>		56		8	Zn, активи-и-	[1091]

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
502	3.4.24.-	"	" <i>adamanteus</i> I и II	24	1ц.	9-10	ручей Ca	[1092]
503	3.4.24.-	"	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	23	1ц., о.		Zn, H-протеи- наза	[1093]
504	3.4.24.2	"	Желудочный сок <i>Sepia</i>	21		7,5	Zn (Ca-зави- симая)	[1094]
505	3.4.24.3	Комплагеназа	<i>Clostridium histolyticum</i> A	105	(4×25)		Zn	[1095]
506	3.4.24.4	Микробные металло- протеиназы	<i>Aeromonas proteolytica</i>	34,8	1ц.	7	Zn	[1096]
507		"	<i>Aspergillus oryzae</i>	41	1ц.	5,6	Co	[1097]
508		"	<i>Bacillus brevis</i>	35		6,7	Zn, 2 формы t опт 60°C.	[1098] [1099]
509		"	" <i>eubtilis</i> A.	35,1	1ц., о.	6,5-7,5	2 формы	[1100, 1101]
510		"	" <i>thermoproteolyticus</i>	37,5	1ц., о.	8	Zn, Ca	[1102]
511		"	" <i>steatothermophilus</i>	36	1ц., о.	8	термолитин	[1103]
512		"	" <i>thuringiensis</i>	78		6,5	Zn, Ca	[1104]
513		"	" <i>amycoliquefactens</i>	33	1ц., о.	8	"ингибитор A"	[1105]
514		"	" <i>mesentericus</i>	33	1ц., о.	8	Zn, Ca	[1106]
515		"	<i>Escherichia coli</i>	110	1ц., о.	7,4	То же	[1107]
		"	То же	75	1ц.	8,5-9	Zn, Co, [1108, протеаза III, 1109]	[1110]
516		"	<i>Escherichia freundli</i>	45,4	1ц.	10	протеаза Pi	[1111]
517		"	<i>Legionella pneumophila</i>	38		6,7	Zn	[1112]
518		"	<i>Penicillium roqueforti</i>	20	1ц.	5,5	Co	[1113]
519		"	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	1ц., о.	8	Эластаза	[1114, 1115]
520		"	То же	48,5	1ц.	7-9	Co, Zn	[1116]
521		"	<i>Serratia</i> sp.	46	1ц., о.		Zn	[1117, 1118, 1119]
522		"	<i>Staphylococcus aureus</i>	28	1ц.	7,4	Протеаза III	[1120]
523		"	<i>Streptococcus cremoris</i>	80	(2×40)		Zn	[1121]
524		"	" <i>faecalis</i>	31,5	1ц.	6-8	Zn	[1122]
525		"	<i>Streptomyces moderatus</i>	21	1ц.	9	Zn	[1123]
526		"	<i>Thermus</i> sp.	21	1ц., гл.	8	Zn	[1124]
527		"	<i>Trichorhynchon granulosum</i>	34,3	1ц.	9,5	Zn	[1125]
528	3.4.24.5	Нейтральная протеиназа	Хрусталик глаза	250	Длиер	7,5	Ca, Mg	[1126]
529	3.4.24.6	Пептидаза A	Яд <i>Aegistrakon</i>	22,5	1ц.	8,5	Zn(1), Ca(2)	[1127]
530	3.4.24.7	Комплагеназы позвоночных	Слизистая желудка человека	38	1ц.	7,5-8,5	Ca	[1128, 1129]

531	"	Фибробласты человека	52	1ц., гл., с.	7	Ca, индуцируется онкогеном	[1130]
532	"	Матка крыс	50		7	Ca	[1129, 1131]
533	"	Зубная сумка быка и др.	34		7, 8	Ca	[1095, 1132]
534	Коллагеназа	<i>Achromobacter torquans</i>	70	(2×35)		Zn	[1133-1135]
535	"	<i>Trichorhynchus schoenleinii</i>	20	1ц.	6, 5	Ca, Mg	[1136]
536	"	Планария <i>Planorbis keshense</i>	47	(2×25)			[1137]
537	Протеогликан расщепляющая протеиназа	Кожа человека	120-150	гл.	7-7, 5	Ca	[1138]
538	То же	Опухоли крыс и др.	30-34	1ц.	7	Ca, Zn	[1139, 1140]
539	"	Синовиальные фибробласты и другие ткани кролика, крыс	21-28	1ц., гл., с.	5-9	"Строме-лизин" в [10в]	[1141, 1142, 1143]
540	Желатиназа	То же	45	1ц., гл., с.			[1144-1146]
541	Кератиназа	Костные клетки кролика <i>Trichorhynchus mentagorhynchus</i>	65	1ц.	7		[1147]
542	Мембранная металло-эндопептидаза	Почки и слизистая кишечника человека и др.	48		8		[1148]
543	То же	Почки мышей	90-93	1ц., гл., с.	6-7	Zn	[1149-1153, 1154]
544	"	Мозг быка, свиньи	320	(4×81), гл.	9, 5	Zn, Ca	[1155, 1156]
545	"	" человека, крыс	87-90			"Мегрин"	[1157, 1158]
546	Митохондриальная протеаза	Печень крыс	50-58	1ц.	7-9	Zn	[1159, 1160]
547	"	Надпочечники быка	108		7	Zn	[1161, 1162]
548	РАВА-протеиназа	Тонкий кишечник человека	60-70		8, 5-9	Co, Mn	[1163]
549	Высокомолекулярная протеаза	Эритроциты и др.	200	(2×100)	7, 5-8	Zn	[1164]
550	Фермент "вылупления"	Морской еж	300	(2×115)	8, 5	Zn, Co	[1165]
551	"	<i>Oguztes latipes</i>	28, 5	1ц.		Ca	[1166]
552	Протеиназа	<i>Ancylotostoma caninum</i>	24	1ц.	8, 2	Zn, 2 формы	[1167]
553	"	<i>Astascus fluviatilis</i>	37		8-9	Fe, эласто-литическая	[1168, 1169]
554	Гистон-специфическая протеаза	Морской еж	22, 6	1ц., с.	9-11	Zn, Co	[1170]
555	Иммуноглобулин А протеаза	<i>Streptosarcosus</i> sp.	41		8		[1171, 1172]
556	Прокollaген N-протеиназа	Бычья аорта	72		7-11		[1173]
557	То же	Эмбрион цыпленка	500	(61, 120, 135,	7	Ca, активиру-	[1174]

Таблица 12 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
558	3.4.24.-	Прокollaген С-протеиназа	То же	80	161)		ются субъ- единицы 135 и 161	[1177] [1178]
559	3.4.24.15	Растворимая металло- протеиназа	Почки человека	100	4ц.			
560		То же	" крнс	260	2ц. (122, 148)	7.5	Ca, Mg	[1179]
561		"	Цитозоль печени крнс	200	(110, 74, 40)	7.5	Ca	[1180]
562		"	Мозг крнс	90	3ц.	7	Соматостатин 28-конвер- таза	[1181, 1182]
563		"	" быка	58		7	Расщепляет проокситоцин	[1183]
564	3.4.24.16	Нейротензин расщепляющая протеиназа	" крнс, морских свинок	70-75				
565	3.4.24.-	Эндонептидаза	Почки крнс	220	2x2 (80, 74)	7.3	Zn	[1184]
566	3.4.24.-	Пептидаза майса	<i>Gea mayis</i>	83-92		7-8	3 формы	[1185] [1186]
567	3.4.24.-	Протеаза хлоропластов	Горох	180		9		[1187]
568	3.4.24.-	Протеиназа	Семена гречихи	34	1ц.	8.3	Zn	[1188]
569	3.5.1.26	4-N-(2- β -D-глюкозаминил)- L-аспарагиназа	Почки свиньи	70		5.5		[1189]
570	3.5.1.56	Диметилформамидаза	<i>Pseudomonas</i> sp.	250	(2x15, 2x105)	5-6	Fe	[1190]
571	3.5.1.68	Формилглутаматдеформилаза	Яичники крнс		4ц.		Mn, Ca, мембранная	[1191] [1192]
572	3.5.1.-	N-Ацетилпролинамидо- гидролаза	<i>Pseudomonas</i> sp.	около 600	(?x55)	6		
573	3.5.2.6	β -Лактамаза II	<i>Bacillus cereus</i> 569/H	35.6	1ц., гл.	6-7		[1193-1195]
574	3.5.2.11	Лизинлактамаза	<i>Streptococcus</i> sp.	250	(4?x63)		Zn	[1196]

* Сокращения: ц. - Цепь; гл. - гликопротеин; с. - известна первичная структура; число цепей дано в скобках, например, 2ц. (128, 95) - две цепи с молекулярной массой 128 и 95 кДа; для субединичных белков дано число субединиц и их молекулярная масса, например, (2x35) - две субединицы по 35 кДа.

** Курсивом даны ссылки, содержащие информацию о первичной структуре.

вая протеаза из морской звезды *Dermasterics imbricata* не подавляется белковым ингибитором, тогда как все сходные с ней трипсиноподобные протеазы очень чувствительны к этому ингибитору [184].

Другой достаточно общий признак сериновых амидгидролаз тот, что большинство их функционирует в нейтральной или слабощелочной среде. Однако такие же ферменты есть среди металлосодержащих амидгидролаз.

К сериновым протеазам относятся многие весьма важные ферменты. Здесь можно отметить протеазы системы свертывания крови (см. табл.12), протеазы системы комплемента, т.е. системы первичного иммунного ответа у позвоночных, важные ферменты пищеварительного тракта – энтеропептидаза, трипсин, химотрипсин и др. Среди сериновых амидгидролаз встречаются ферменты относительно небольшой молекулярной массы (12–15 кДа), а также сложные, построенные из многих субъединиц ферменты (500–600 кДа). Среди этих ферментов встречаются и такие, которые чувствительны не только к ДИФ, но и к реагентам на тиоловую группу.

Цистеиновые амидгидролазы (см. обзор: [185]) ингибируются реагентами, специфически взаимодействующими с SH-группой остатка цистеина: N-этилмаленимидом (N-ЭМИ), йодацетатом, *n*-хлормеркурийбензоатом и др. Обычно ферменты этой группы активируются меркаптанами и другими тиолсодержащими веществами. Однако этот тест неоднозначен, так как тиолы могут реагировать с дисульфидными связями в белке, что часто приводит к снижению каталитической активности. Большинство цистеиновых амидгидролаз функционирует в слабокислой и нейтральной средах (рН 5–7), однако встречаются ферменты этой группы, способные функционировать и при слабощелочных значениях рН.

К цистеиновым амидгидролазам принадлежат многие ферменты растительного происхождения: папаин, фицин, бромелаин, пептидазы А и В и др., а также ряд лизосомальных ферментов: катепсины В, L, Н и др. Значительный интерес представляют Ca^{2+} -зависимые протеазы – калпаины (см. обзор: [186]).

Аспартатные амидгидролазы в большинстве своем функционируют при кислых значениях рН. Исключение составляет фермент плазмы крови ренин, способный катализировать гидролиз амидов при рН 6–7. Активность аспартатных амидгидролаз подавляется diaзокетонами (например, diaзооксонорлейцином и др.), некоторыми эпокисоединениями и микробным ингибитором пепстатином. Среди этой группы ферментов есть несколько нечувствительных к пепстатину. Особенно интересен фермент из *Scytalidium lignicolum*. Показано (см. разд.2.6.3), что в активном центре этого фермента функционирует остаток не аспарагиновой, а глутаминовой кислоты. В этой связи старое название этой группы карбоксильные амидгидролазы – представляется более оправданным.

К аспартатным протеазам относятся все пищеварительные ферменты желудка (пепсины), некоторые лизосомальные протеазы (катепсины D и E) и многие протеиназы низших грибов. Интереснейшими представителями этой группы ферментов являются протеазы ретровирусов, в том числе вируса иммунодефицита человека.

Одну из больших групп амидгидролаз составляют металлосодержащие ферменты. Они содержат в своем составе ионы цинка, кобальта или марганца. Некоторые из них (например, термолизин) содержат наряду с одним из этих металлов также ионы кальция, играющего важную роль в стабилизации пространственной структуры фермента. Известно несколько ферментов этой группы, у которых Ca^{2+} или Mg^{2+} являются единственными металлами, важными для катализа

Все металлсодержащие амидгидролазы инактивируются хелатирующими реагентами, такими, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или о-фенантролин. Инактивация эта чаще всего обратима, т.е. добавление иона металла восстанавливает активность.

Следует отметить, что и среди других типов амидгидролаз существуют металлсодержащие (обычно Ca^{2+} или Mg^{2+}) ферменты. Однако в этих случаях металл, по-видимому, непосредственно не участвует в каталитическом акте и играет вспомогательную роль.

Большинство пептидаз (КФ 3.4.11-17) относится к группе металлсодержащих амидгидролаз. Интересную группу составляют аминопептидазы ворсинок тонкого кишечника и почечных канальцев. Это в большинстве своем мембранно-связанные ферменты, локализованные так, что почти вся молекула вместе с активным центром расположена на поверхности мембраны, однако часть ее (4-5 кДа) образует "якорь", пронизывающий липидную мембрану.

К металлсодержащим протеазам относятся многие ферменты термофильных микроорганизмов (термолизин, фермент *Bacillus stearothermophilus*, фермент из *Telarcomyces diponti* и др.). Для этих ферментов оптимальная температура функционирования составляет 60-65°, и они устойчивы при нагревании до 90-100° (см. обзор: [187]). К этой же группе относятся многие коллагеназы и некоторые β-лактамазы, тогда как другие ферменты, выполняющие те же функции, относятся к другим (сериновым, цистеиновым) группам амидгидролаз.

Нельзя не отметить очень интересный механизм деградации аномальных белков, обнаруженный как в эукариотических [188,189], так и прокариотических [190,191] клетках. В ретикулоцитах этот механизм связан с АТФ-зависимым ацилированием таких белков особым низкомолекулярным белком - убикитином (APF-1) [192,193]. Ацилирование происходит по ε-аминогруппам остатков лизина аномального белка и образующийся конъюгат затем расщепляется специфическими протеиназами [194], которые относятся, по-видимому, к группам сериновых и цистеиновых амидгидролаз [189,195]. У *Escherichia coli* до сих пор не найдено белка, аналогичного убикитину. Очевидно, деградация аномальных белков у прокариот происходит по механизму АТФ-зависимого протеолиза без участия убикитинподобных факторов. Ключевую роль в этом процессе играет АТФ-зависимая Ia-протеиназа, структура которой была установлена в 1988 г. Этот фермент - продукт гена *lon* - является белком теплового шока и проявляет как протеиназную, так и АТФазную активности.

Еще одна интересная группа протеиназ - это мультикаталитические протеиназы (см. обзор: [196]) - ингенсин и макропаин. Они обладают химотрипсиновой, трипсиновой и эластазной специфичностью, состоят из сравнительно небольших субъединиц, объединенных в высокомолекулярные комплексы. Возможно, что к этой же группе принадлежит щелочная протеаза из мышц карпа [197], которую пока не удалось отнести к какой-либо группе амидгидролаз.

В число неклассифицированных амидгидролаз (КФ 3.4.99.) входят многие интересные ферменты, такие, как алифатические амидазы микроорганизмов [199-202], триптофанамидаза [203], теанин-гидролаза [204], пантотеингидролизующий фермент [205], гликопептидазы, отщепляющие аспарагинсвязанную углеводную цепь в гликопротеинах [206-208], а также амидазы, действующие на циклические амиды - аминокпролактан [209], кератин [210] и диоксопиперазин [211].

Особого упоминания заслуживают протеиназы *Lysobacter* (КФ 3.4.99.29-30)

[1212]. Эти ферменты не ингибируются ни одним из известных ингибиторов, специфичных для указанных четырех групп амидгидролаз. Однако это может быть связано с особенностями их структуры в целом, а не с особенностями их активных центров.

Анализ данных, представленных в табл.12, приводит еще к одному важному выводу – принадлежность фермента к той или иной группе амидгидролаз, по-видимому, никак не связана с его функцией. Другими словами, одна и та же функция, например гидролиз пептидогликанов клеточной стенки бактерий может выполняться ферментами, имеющими совершенно разные каталитические группировки. Справедливо также и обратное – ферменты одной группы могут проявлять совершенно разную специфичность как *in vitro*, так, вероятно, и в живом организме.

2.4. Первичная структура

Первичная структура, т.е. последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка, известна полностью или частично для значительной части охарактеризованных амидгидролаз (см. табл.12, а также [1197]). Особенно быстрыми темпами эта информация стала появляться с развитием методов рекомбинантных ДНК [177], позволяющих заменить традиционные и весьма трудоемкие методы белковой химии методами секвенирования соответствующих генов. При этом появился и ряд качественно новых возможностей. Во-первых, оказалось возможным устанавливать структуру не только созревших форм белков, но и их предшественников – про- и препро-ферментов (см. гл.5). Это, в частности, привело к пониманию процессов проникновения белков через клеточные мембраны и выхода ферментов во внеклеточное пространство [1198]. Для эукариотических ферментов, как и других белков эукариот, было установлено, что лишь небольшая часть генетической информации реализуется в последовательности аминокислотных остатков. Так называемые интроны, составляющие большую часть, не транскрибируются, и в отношении их роли существует множество гипотез. Несомненно лишь, что интрон-экзонная структура генов имеет важное эволюционное значение. Вероятно, что интроны определяют, в частности, доменную организацию белковой молекулы [1199,1200] (см. разд.2.5).

Уже в середине 1960-х годов было отмечено сходство в строении многих родственных по происхождению и функциям ферментов [1201]. В настоящее время сопоставление структур белков из разных источников служит важной основой установления филогенетических взаимоотношений разных организмов [1202]. Предложены достаточно надежные методы такого сопоставления (см., например: [1203]), при котором удобно пользоваться однобуквенным кодом аминокислотных остатков (см.: [1204] и примеч. к табл.14).

2.4.1. Сериновые амидгидролазы

Довольно условно ферменты этой группы можно разделить на четыре подгруппы: 1) протеазы поджелудочной железы, 2) ферменты крови, 3) ферменты беспозвоночных, 4) микробные амидгидролазы.

Внутри каждой подгруппы наблюдается особенно высокая степень гомологии в первичной структуре. Сходство в структуре ферментов, относящихся к разным

подгруппам, в целом менее выражено. Следует подчеркнуть, что при сравнении первичных структур разных белков очень важен метод, используемый для этой цели. Эволюционные взаимоотношения белков группы сериновых протеаз характеризуются или общим числом случайных эволюционных изменений, или минимальным числом оснований, различающихся в ДНК, кодирующих данные белки (табл.13).

Как видно из табл.13, наименьшие отличия наблюдаются у одинаковых ферментов различного происхождения (например, трипсина быка и свиньи). Для отдаленных видов, как, например, трипсины млекопитающих, с одной стороны, и акулы – с другой, различия заметно выше. Что же касается разных подгрупп (тромбин и ферменты поджелудочной железы), то отличия здесь еще более существенны.

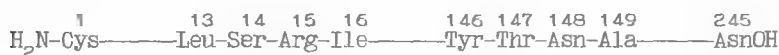
Наиболее исследованными ферментами группы протеаз поджелудочной железы являются химотрипсин А и трипсин. Химотрипсин А известен в нескольких формах, образующихся из зимогена – химотрипсиногена А – при его активации. Чаще всего используют химотрипсин A_α (или α -химотрипсин), представляющий собой трехцепочечный белок с короткой (13 остатков) А-цепью и более длинными

Таблица 13. Сравнение первичных структур протеаз позвоночных* [1203]

Фермент	Химо- трипсин А	Химо- трипсин В	Эластаза свиньи	Трипсин быка	Трипсин свиньи	Трипсин акулы
Химотрипсин В	138 (62)	—	—	—	—	—
Эластаза свиньи	723(192)	723(192)	—	—	—	—
Трипсин быка	744(163)	633(171)	788(187)	—	—	—
Трипсин свиньи	463(153)	519(162)	— (188)	71 (46)	—	—
Трипсин акулы	767(171)	753(172)	978(192)	358(110)	353(104)	—
Тромбин (В-цепь)	1006(197)	1336(204)	886(216)	790(181)	703(175)	754(184)

*Цифры означают общее число случайных эволюционных изменений.
В скобках – общее минимальное число различающихся оснований в ДНК.

В-(131 остаток) и С-(195 остатков) цепями, связанными между собой пятью дисульфидными мостиками. Соотношения между α -химотрипсином и другими химотрипсинами показаны ниже [1205]:



Химотрипсиноген А

Разрывы 13-14 – π -химотрипсин,

13-14; 15-16 – δ -химотрипсин,

15-16; 146-147 – μ -химотрипсин,

15-16; 148-149 – ω -химотрипсин,

13-14; 15-16; 146-147 – $\alpha_1(\chi)$ -химотрипсин,

13-14; 15-16; 146-147; 148-149 – $\alpha(\gamma)$ -химотрипсин.

Трипсин также существует в нескольких формах [292,1206,1207].

Кроме одноцепочечного β -трипсина, обнаружены ферменты с разрывами поли-

пептидной цепи в положениях Lys131-Ser132 (α -трипсин), Arg105-Val106 (γ -трипсин) и Lys49-Ser50 (δ -трипсин). Последний сохраняет около 10% активности β -формы.

Практически отсутствует гомология первичных структур протеаз животного и микробного происхождения. Но и в этих случаях наблюдается сохранение небольших последовательностей на определенных участках молекул ферментов у животных и некоторых микроорганизмов. Так, типичные панкреатические протеазы - химотрипсин, трипсин и др. - имеют сходные последовательности в области остатков Ser195 (нумерация по последовательности химотрипсина), His57 и N-концевого участка с такими микробными протеазами, как α -литическая протеаза *Lysobacter* sp. и протеаза А проназного комплекса *Streptomyces griseus*. Как видно из табл.14, значительный консерватизм в первичных структурах сравниваемых участков наблюдается для сериновых протеаз поджелудочной железы, плазмы крови, лизосомных сериновых эндопептидаз, коллагеназ и лишь нескольких микробных ферментов. Все они имеют разветвленный гидрофобный остаток (изолейцин или валин) на N-конце, остатки Val и Gly в положениях 2 и 4 соответственно, одинаковую последовательность AlaAlaHisCys в положениях 55-58 и последовательность GlyAspSerGlyGlyPro в положениях 193-198. Большинство микробных сериновых протеаз существенно отличаются от протеаз животных и в этих участках, однако внутри каждой группы постоянство последовательностей весьма устойчиво. Интересно отметить заметное сходство микробных протеаз, D-аланилкарбоксипептидаз и β -лактамаз I в области остатков 190-200. Хотя последовательности здесь неидентичны, все же замены имеют в большинстве случаев эквивалентный характер, т.е. Thr $\rightarrow$ Ala, Thr $\rightarrow$ Met и т.п. Несмотря на резкие отличия в последовательностях аминокислот у протеаз животного и микробного происхождения, эти ферменты довольно сходны в отношении пространственной структуры каталитически важных участков. Протеазы животных являются, по-видимому, продуктом дивергентной эволюции, т.е. происходят от общей для них сериновой "пропротеазы", возникшей на ранних этапах развития организмов. Микробные протеазы по отношению к протеазам животных - пример конвергентной эволюции, в ходе которой разные организмы вырабатали общий механизм катализа, исходя из разных белковых структур.

2.4.2. Цистеиновые амидгидролазы

Все цистеиновые амидгидролазы содержат свободную SH-группу остатка цистеина, блокирование которой приводит к полной потере каталитических свойств. Тиоловая группа весьма чувствительна к окислению и даже в чистых препаратах цистеиновых ферментов часто обнаруживается меньше, чем одна SH-группа из-за присутствия молекул с окисленной группой, потерявших способность к активации [1208]. Сравнение последовательности аминокислот в таких цистеиновых протеазах растений, как папаин, фицин, бромелаин и актинидин, показывает значительную степень их гомологии. Особенно значительно сходство этих четырех ферментов в области каталитически активного остатка Cys25 и в области одного из остатков His (табл.15).

Сравниваемые последовательности у растительных протеаз и микробного фермента практически идентичны. Особенно интересны данные, полученные [720] для катепсина В из печени крыс: последовательность в области остатка цисте-

Таблица 14. Последовательность аминокислотных остатков в каталитически важных участках некоторых сериновых амидиолитраз*

Номер в табл.	Фермент	Номер остатка (нумерация химотрипсиногена А быка)**									
		1617181920	555657585960	100101102103104105	190191192193194195196197198199						
24	Карбоксипептидаза У	K I D P K	G G H M V P	D K D F I C	H I A G E S	Y A G					
36	Химотрипсин А, бык	I V N G E	A A H C G V	N N D I T M L	S C C Q G D S	G G P P L					
52	Трипсин, бык	I V G G Y	A A H C G V	I N D I G L	A C H G D S	G G P L					
63	Трипсин <i>Veprga orientalis</i>	I V G G T	A A H C L V	I N D I G L	A C H G D S	G G P L					
69	Тромбин, человек	I V E G Q	A A H C L L	N L D R D I	A C E G D S	G G P					
82	В-цепь α-Литическая протеиназа	I V G G I	A G H C G T	G N D R A W	S C M G D S	G G P L					
86	Субтилзин BPN	A Q S V P	N S H G T H	V I D S G I	A Y N G T S	M A S P					
105	Протеаза <i>A Streptomyces griseus</i>	I A G G E	A G H C T S	N N D Y G I	A Q P G D S	G G S L					
114	Протеиназа К	A A Q T N	N G H G T H	V I D T G I	R S I S T S	M A T P					
139	Калепсин G	I I G G R	A A H C W G	Q N D I M L	A F K G D S	G G P L					
157	Фактор коагуляции XIIa, человек	I V G G T	A A H F Y G	G Y D I A L	A C K G D S	G G P L					
168	Коллагенолитическая протеиназа	I V G G V	A A H C M D	S N D I A V	T C D G D S	G G P L					
180	<i>Uca pugnator</i> Эластаза панкреатическая, свинья	V V G G T	A A H C L V	G Y D I A L	G C M G D S	G G P L					
187	Химтаза I	I I G G V	A A H C K G	L H D I M L	A F K G D S	G G P L					
189	Триптаза, собака	I V G G R	A A H C V G	G A D I A L	S C Q G D S	G G P L					
204	Фактор D системы комплемента	I L G G R	A A H C L E	D H D L L L	S C K G D S	G G P L					
249	Протеаза собомовирусов		P H N V W Y	R I D F V L	T A K G H S	G S Y					

* Литературные источники см. табл. 12.

** Однобуквенный код [1204]: A - Ala, B - Asx, C - Cys, D - Asp, E - Glu, F - Phe, G - Gly, H - His, I - Ile, K - Lys, L - Leu, M - Met, N - Asn, P - Pro, Q - Gln, R - Arg, S - Ser, T - Thr, V - Val, W - Trp, X - ?, Y - Tyr, Z - Glx.

ина у этого фермента полностью идентична последовательности растительного фермента папаина. Несколько отличается по структуре химопапаин. В целом гомология первичной структуры катепсинов В и Н с папаином составляет соответственно 30 и 40% [721], а в области активного центра – 92 и 75% [1209].

Представляет интерес структура Са-зависимых протеаз – калпаинов. Это белки, состоящие из двух цепей (80 и 30 кДа). Тяжелая, каталитическая цепь содержит 4 домена, причем домен 2 (остатки 100–300) гомологичен другим типичным цистеиновым протеазам, а домен 4 (остатки 550–700) имеет большое сходство с Са-связывающими белками, такими, как кальмодулин, тропонин С и пр. [772].

Обращает на себя внимание консерватизм остатка глицина в положении 23. У большинства сериновых протеаз остаток глицина также расположен на удалении двух остатков от каталитически важного (серинового) остатка (см. табл.14). Особая роль глицина, по-видимому, заключается в его способности образовывать так называемый β -изгиб в полипептидной цепи, что создает особую структуру вблизи каталитически активного остатка сериновых и цистеиновых протеаз.

Интересно отметить определенное сходство цистеиновых протеиназ ряда вирусов и сериновых протеиназ [656,815,816]. Вероятно, оба эти семейства ферментов произошли от общего предшественника, обладавшего протеолитической активностью, причем каталитически активный остаток цистеина в ходе эволюции трансформировался в остаток серина (ср.: [1210]).

2.4.3. Аспартатные амидгидролазы

В последние годы появились сведения о первичной структуре значительного числа аспартатных протеаз животного и микробного происхождения. Сопоставление последовательностей у представителей этих двух групп ферментов ясно указывает на их эволюционное родство. Как и у протеаз других типов, сходство между последовательностями ферментов животных существенно больше, чем между ферментами животных и микроорганизмов.

Так, при сравнении зимогенов аспартатных протеиназ из 373 остатков (наиболее длинная из известных последовательностей – прохимозин) 175 остатков (т.е. 47%) идентичны у всех протеаз животных и лишь 63 остатка (17%) идентичны у протеаз животного и микробного происхождения [1211]. Интересно, что идентичные остатки и последовательности сгруппированы в "кластеры" – примерно две трети идентичных остатков покрывают лишь 20% полипептидной цепи. Как и у других типов амидгидролаз, гомология особенно выражена на определенных участках последовательности, которые поэтому можно считать важными для функционирования ферментов. В случае аспартатных протеаз это относится к N- и C-концевым фрагментам и последовательностям вблизи остатков Asp32 и Asp215 (табл.16).

Интересная особенность выявляется при сравнении N- и C-концевого участков аспартатных протеаз, особенно участков в области остатков Asp32 и Asp215. Здесь наблюдается значительная внутренняя гомология. Это обстоятельство трактуется [1212] как свидетельство общего происхождения аспартатных протеаз животных и низших грибов, причем современные белки являются

Таблица 15. Последовательность аминокислот в области каталитически важных остатков некоторых цистеиновых амидгидролаз*

Номер в табл. 12	Фермент	Номер остатка (в последовательности пептида)															
		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	158	159	160	161	162	163
279	Катепсин В (легкая цепь)	D	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	G	H	A	I	R	I
283	Папаин	N	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	D	H	A	V	A	A
284	Фицин	Q	Q	G	C	G	S	C	W	A	A	D	H	A	V	A	L
285	Бромелаин	Q	Q	N	P	C	G	S	C	W	A	N	H	A	V	T	A
287	Химопалаин А	N	Q	G	A	C	G	S	C	W	A	D	H	A	V	T	A
297	Протеиназа <i>Streptomyces albus</i>	G	Q	A	A	T	G	H	C	V	A	G	H	A	V	A	A
298	Актинидин	S	Q	G	E	C	G	G	C	W	A	D	H	A	I	V	I
303	Капаин I	C	Q	G	A	L	G	D	C	W	L	G	H	A	Y	S	V

* Литературные источники см. табл. 12.

Таблица 16. Участки первичной структуры аспаргатных амидгидролаз*

Номер в табл. 12	Фермент	Номер остатков в последовательности пептина свиный																						
		-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	30	31	32	33	34	213214215216217218	322323324325326327						
349	Пепсин А человека	V	D	E	Q	R	L	E	N			V	F	D	T	G	T	G	L	A	A	P	V	A
350	Пепсин А свиньи	I	G	D	E	P	L	E	N			I	F	D	T	G	T	G	L	A	A	P	V	A
350	Пепсин А быка	V	S	Q	E	P	L	Q	N			I	F	D	T	G	T	G	L	A	A	K	V	A
352	Пепсин кур	V	L	T	V	V	T	E	P	L	L	V	F	D	T	G	T	G	L	A	A	K	A	A
354	Пепсин С человека	G	S	V	A	S	V	P	L	T	A	L	F	D	T	G	T	G	L	A	A	K	A	A
357	Химозин А											L	F	D	T	G	T	G	L	A	A	K	A	A
372	Пепсин <i>Aspergillus awamori</i>		V	A	T	N	T	P	T	A		L	F	D	T	G	T	G	L	A	A	A	Q	A
374	Пенициллопепсин	A	A	S	G	V	A	T	N	T	P	T	A				T	G	F	A	A	P	Q	A
376	Пепсин <i>Rhizopus chinensis</i>	A	G	V	G	T	V	P	M	T	D	Y	G				T	Q	I	A	A	P	V	A
407	Протеаза ВИЧ-1 (HIV-1)		P	Q	I	T	L	W	Q	R		L	L	D	T	G	A)**	G	C	T	L	L	Q	P

* Литературные источники см. табл.12.

** В димере.

* Литературные источники см. табл. 12.

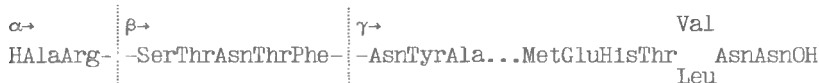
** В димере.

продуктами дупликации гена их общего предшественника. Возможно, что этот предшественник был близок по структуре современным ретровирусным протеиназам, которые имеют сходство с одним доменом аспартатных протеиназ животных и активны лишь в состоянии димера [939].

2.4.4. Металлсодержащие амидгидролазы

Группа металлсодержащих амидгидролаз весьма многочисленна и разнообразна как по размеру и свойствам, так и по их функциональной специфичности. Как и у других групп ферментов наблюдается гомология отдельных участков в структуре довольно отдаленных по происхождению и специфичности металлсодержащих гидролаз (табл.17). Эта гомология особенно характерна для связывающих металл участков и каталитически активных групп.

Панкреатическая карбоксипептидаза А имеет довольно большое число форм, различающихся N-концевыми аминокислотами и одной из аминокислот на С-конце молекулы. С-Концевая последовательность фермента может иметь в положении 3 с С-конца Val или Leu. Кроме того, каждая из этих форм в зависимости от условий активации зимогена и метода выделения может иметь разную длину полипептидной цепи [1213]:



Карбоксипептидаза А имеет один дисульфидный мостик, а карбоксипептидаза В - три S-S-мостика и одну свободную SH-группу [1214]. Термолизин, построенный из 316 аминокислотных остатков, не содержит дисульфидных связей. Интересно отметить наличие в положениях 27-30 последовательности гидрофобных остатков TyrTyrTyrLeu. Еще более внушительный кластер гидрофобных остатков обнаружен в молекуле лейцинаминопептидазы из хрусталика глаза быка (остатки 64-69).

2.4.5. Небелковые составляющие

Молекулы многих амидгидролаз являются гликопротеинами. Это особенно характерно для внутриклеточных ферментов эукариот и ферментов крови (см.: табл. 12). Гликопротеинами являются некоторые протеазы растений, например, кукумизин, фицин и бромелаин. У прокариот наличие сахарных остатков, связанных с белком, весьма редкое явление. Так, сахара обнаружены у лактамазы II из *Bacillus cereus*.

Среди сахаров наряду с обычными гексозами часто встречаются аminosахара и сиаловые кислоты. Такие остатки заметно влияют на электрофоретическую подвижность и хроматографическое поведение белка, но, как правило, не влияют на каталитические свойства.

Существуют два типа связи олигосахаридных остатков с белком: O-гликановая, когда сахар связан гликозидной связью с гидроксильными группами остатков серина или треонина и N-гликановая, где полисахаридная цепь связана с атомом азота боковой цепи остатка аспарагина. Этот последний обычно входит в последовательность Asn-X-Thr (Ser).

Другой тип небелковых составляющих встречается у мембранных ферментов. Это остаток гликозилфосфатидилинозита, выполняющего функцию "якоря" при

Таблица 17. Участки первичной структуры металлодержащих амидгидролаз*

* Литературные источники см. табл. 12.

связывании белка с липидной мембраной. Такой остаток обнаружен, в частности, у аминопептидазы Р из ворсинок почечных канальцев [1215].

Ряд протеаз содержит в своем составе фосфатные группы. Так, пепсин А свиньи содержит остаток фосфорной кислоты, образующий фосфоэфирную связь с гидроксильной группой Ser68 [838]. Отщепление фосфатной группы (образование пепсина D) никак не сказывается на ферментативных свойствах пепсина [1216]. Эта группа расположена в весьма подвижном участке фермента [1217].

Из необычных аминокислот следует упомянуть γ -карбоксилглутаминовую, обнаруженную в тромбине [317] и других витамин К зависимых ферментах [1218] и играющую важную роль в связывании ионов кальция.

2.5. Пространственная структура

Наиболее важной характеристикой фермента с точки зрения его каталитических свойств и механизма действия является пространственная, или третичная, структура. Сведения о пространственной структуре белков получают методами рентгеноструктурного анализа [1219], причем для суждения о деталях строения молекулы необходимо разрешение как минимум 2,7–2,8 Å. Важной характеристикой качества кристаллографической модели является степень уточнения, определяемая величиной так называемого R-фактора. $R = \sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$, где $|F_o|$ и $|F_c|$ – экспериментальные и вычисленные факторы структурных амплитуд. В настоящее время рентгеноструктурные данные с таким и более высоким разрешением получены для многих амидгидролаз, некоторых их зимогенов и большого числа комплексов ферментов с аналогами субстратов (табл.18 и гл.6).

Характерной особенностью большинства исследованных в отношении пространственной структуры амидгидролаз является низкое содержание α -спиральных

Таблица 18. Рентгеноструктурный анализ амидгидролаз и некоторых зимогенов с высоким разрешением

Белок	R-фактор*	Разрешение, Å	Литературный источник
<i>Сериновые амидгидролазы</i>			
α -Химотрипсин быка	0,179	2,8; 2,0; 1,8; 1,67; 1,68	[1220–1226]
γ -Химотрипсин быка	0,173	2,7; 1,9; 1,6	[1225, 1227, 1228]
Химотрипсиноген А быка	0,173	2,5; 1,8	[1229, 1230]
Трипсин быка	0,193	1,8; 1,5	[1231–1236]
Трипсиноген быка	0,166	1,9; 1,8	[1237–1239]
Эластаза свиньи, панкреатическая	0,169	2,5; 1,65	[1240–1242]
Калликреин А, панкреатический	0,220	2,05	[1243]
Тонин	0,196	1,8	[1244]
Химаза II	0,191	1,9	[1245]
Протромбин (фрагмент 1) быка	0,240	2,8	[1246]
Трипсин <i>Streptomyces griseus</i>	0,161	1,7	[1247]

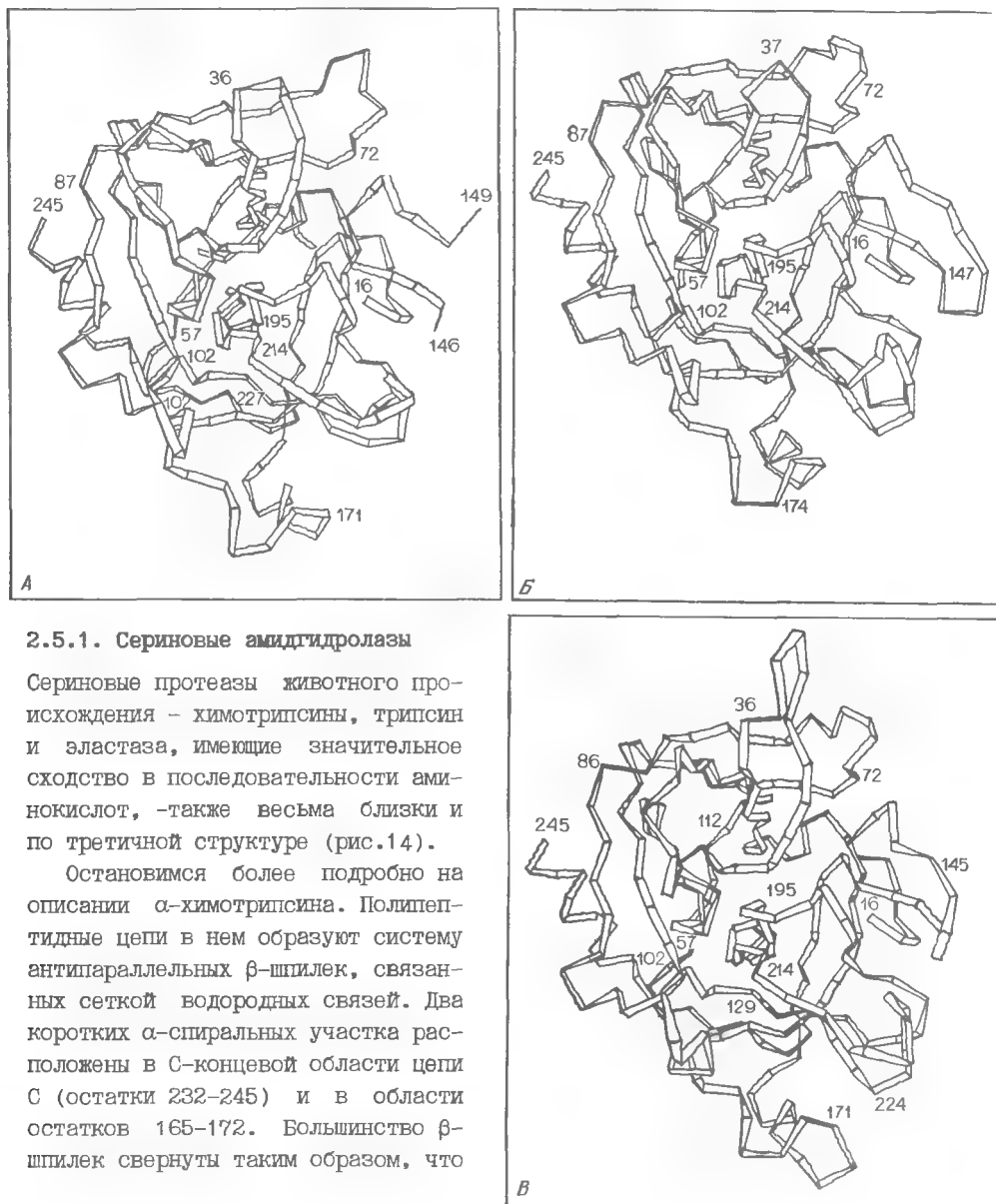
Таблица 18 (окончание)

Белок	R-фактор*	Разрешение, $\text{\AA}$	Литературный источник
Субтилизин <i>Bacillus amyloliquefactens</i>	0,140	1,8	[1248]
Субтилизин BPN' (Novo)	0,230	2,8; 2,0	[1249,1250]
Термитаза	0,240	2,2	[1251]
Протеаза <i>Streptomyces griseus</i> A	0,126	1,8; 1,5	[1252-1254]
Протеаза <i>Streptomyces griseus</i> B		2,8	[1255,1256]
α -Литическая протеаза <i>Lysobacter enzymogenes</i>	0,131	2,8; 1,7	[1257,1258]
Протеиназа K	0,167	1,5	[1259]
D-Аланинкарбоксипептидаза <i>Streptomyces</i> sp. R61	-	2,8	[1260]
β -Лактамаза <i>Bacillus licheniformis</i>	0,208	2,0	[1261]
Цистеиновые амидгидролазы			
Папаин	0,161	2,8; 1,65	[148,1262-1263]
Актинидин	0,171	2,8; 1,7	[1263-1265]
Калотропин DI	-	3,2	[1266]
Аспартатные амидгидролазы			
Пепсин A свиньи	0,174	2,7; 2,0; 1,8	[1267-1270]
Пепсиноген	0,173	1,8	[1271,1272]
Химозин	0,165	2,3	[1273,1274]
Ренин	0,24	2,5	[1275]
Пенициллопепсин	0,136	2,8; 1,8	[1276,1277]
Протеаза <i>Endothia parasitica</i>	0,178	3,0; 2,45; 2,1	[1278-1280]
Протеаза <i>Rhizopus chinensis</i>	0,143	2,5; 1,8	[1278,1281,1282]
Протеаза вируса птичьего миеобластоза	0,26	2,4	[1283]
Протеаза вируса саркомы Рауса	0,15	2,0	[1284]
Протеаза вируса иммунодефицита человека (HIV-1)	0,184	3,0; 2,8	[1285,1286]
Металлосодержащие амидгидролазы			
Карбоксипептидаза A быка	0,190	2,0; 1,54	[149,1287-1289]
Карбоксипептидаза B	0,33	2,8	[1290]
Термолизин	0,213	2,3; 1,6	[1291-1293]
Нейтральная протеаза <i>Bacillus cereus</i>	0,217	3,0	[1294]
Карбоксипептидаза T	0,343	3,0	[1295]
D-Аланил-D-аланин карбоксипептидаза	-	2,5	[1296]

*Для наилучшего разрешения.

участков. Эти белки построены из фрагментов β -структур, соединенных неупорядоченными участками. Во многих ферментах удается идентифицировать домены, из которых построены молекулы этих белков.

Как и следовало ожидать на основании сравнения последовательности аминокислот, сходные по первичной структуре белки имеют сходные пространственные структуры. Поэтому целесообразно далее рассматривать особенности третичной структуры амидгидролаз внутри каждого типа ферментов.



2.5.1. Сериновые амидгидролазы

Сериновые протеазы животного происхождения – химотрипсин, трипсин и эластаза, имеющие значительное сходство в последовательности аминокислот, – также весьма близки и по третичной структуре (рис.14).

Остановимся более подробно на описании α -химотрипсина. Полипептидные цепи в нем образуют систему антипараллельных β -шпилек, связанных сеткой водородных связей. Два коротких α -спиральных участка расположены в С-концевой области цепи С (остатки 232–245) и в области остатков 165–172. Большинство β -шпилек свернуты таким образом, что

Рис.14. Сравнение хода полипептидной цепи α -химотрипсина (А), трипсина (Б) и эласты (Б) [1222]

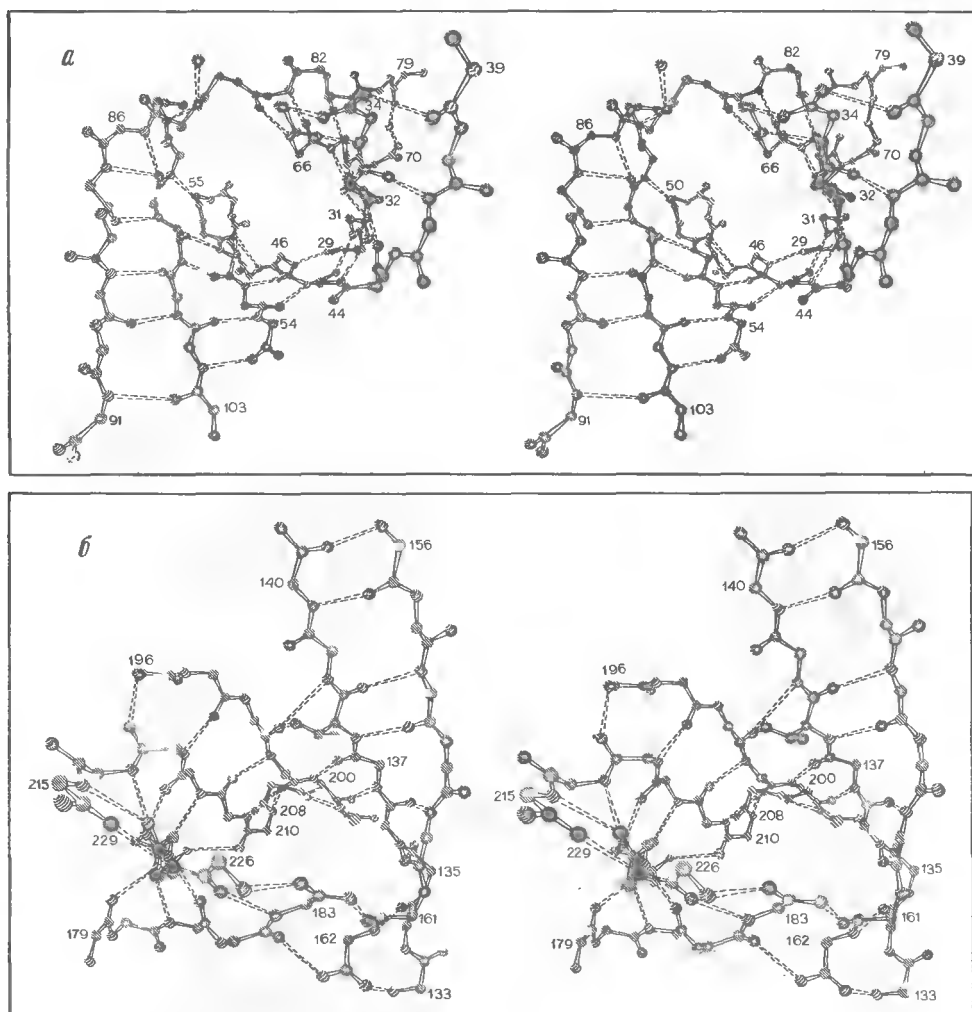


Рис.15. Стереопары, показывающие структуру "цилиндров" I (а) и II (б), образованных полипептидными цепями в α -химотрипсине [1221]

образуют как бы два искаженных цилиндра (рис.15).

Цилиндр I включает остатки 29–112 и состоит из шести антипараллельных цепей. Цилиндр II образуется остатками 133–230 и также включает шесть антипараллельных отрезков полипептидной цепи. Четыре из пяти дисульфидных мостиков входят в состав этого цилиндра.

Боковые группы гидрофобных аминокислот ориентированы внутрь цилиндров, а гидрофильные, как правило, расположены на их поверхности. Оба цилиндра соприкасаются друг с другом, причем некоторые остатки гидрофобных аминокислот ориентированы в область контакта (Trp29, Ile47, Trp51, Val53, Phe89, Ile103, Leu105 и Ile212). С-концевая α -спираль также контактирует с обоими цилиндрами. В области контакта расположено около 10% молекул воды, связан-

ных с белком. Примерно такое же количество молекул воды локализовано внутри глобулы. Остальные 80% связаны с поверхностью молекулы белка [1225].

Конформация основной цепи большинства остатков попадает в разрешенные области на диаграмме двугранных углов ϕ и ψ [1221].

Следует отметить, что α -химотрипсин кристаллизуется в виде димера. Обе молекулы в димере практически одинаковы в отношении конформации основной цепи. Однако конформация боковых цепей, особенно в области межмолекулярных контактов, заметно отличается. То же справедливо при сравнении α -химотрипсина с кристаллами мономерного γ -химотрипсина [1224, 1226].

Эластаза и трипсин построены очень сходным образом. Оба эти фермента также состоят из двух доменов, тесно контактирующих один с другим. Так, в эластазе шесть N-концевых антипараллельных тяжей и шесть C-концевых тяжей образуют два цилиндра, внутренние полости которых, содержащие боковые цепи гидрофобных аминокислотных остатков, представляют собой "гидрофобные ядра" молекулы. Четыре дисульфидные связи эластазы участвуют в стабилизации структуры цилиндров и расположены в местах, эквивалентных положению соответствующих связей в химотрипсине и трипсине. К этим цилиндрам примыкает C-спиральный участок, который в эластазе образуют остатки 234-244 [1240].

Весьма сходными с этими тремя ферментами являются структуры панкреатического калликреина А [1243], тонина [1244] и химазы II тучных клеток [1245]. Основные различия здесь связаны с наружными петлеобразными структурами. Так, у калликреина структуры, окружающие субстратсвязывающий участок, более компактны, чем у трипсина. Аналогичные отличия наблюдаются и у тонина - фермента близкого калликреину. Имеются отличия и в структуре самих связывающих субстрат участков этих ферментов, отражающие различие в их специфичности (см. гл.6).

Две микробные протеазы - α -литическая и протеаза А из *Streptomyces griseus* - по своей первичной структуре, как было показано выше, довольно близки сериновым протеазам животных. Эта близость проявляется также и на уровне третичных структур [1297]. Около 55% C_{α} -атомов α -литической протеазы топологически эквивалентны соответствующим остаткам в эластазе [706]. Аналогично топологическая эквивалентность протеазы А и химотрипсина составляет 64%. Следует отметить, что гомология первичных структур эластазы и α -литической протеазы, а также протеазы А и химотрипсина существенно ниже и составляет соответственно 18 и 21%.

Оба микробных фермента очень близки в отношении пространственной структуры (рис.16). Соответственно и гомология первичных структур этих протеаз составляет 35%. Топологическая эквивалентность этих двух протеаз составляет 82%. Полипептидная цепь α -литической протеазы свернута так, что она образует два гидрофобных домена, каждый из которых включает четыре антипараллельные β -петли. Область контакта доменов заполнена боковыми цепями аминокислотных остатков и имеет довольно высокую электронную плотность. α -Спиральный участок протеазы включает лишь три витка (остатки 231-238). Интересно отметить, что один из остатков пролина (Pro99a) имеет *цис*-конфигурацию. Такое же положение наблюдается у соответствующего остатка в протеазах А и В *Streptomyces griseus*.

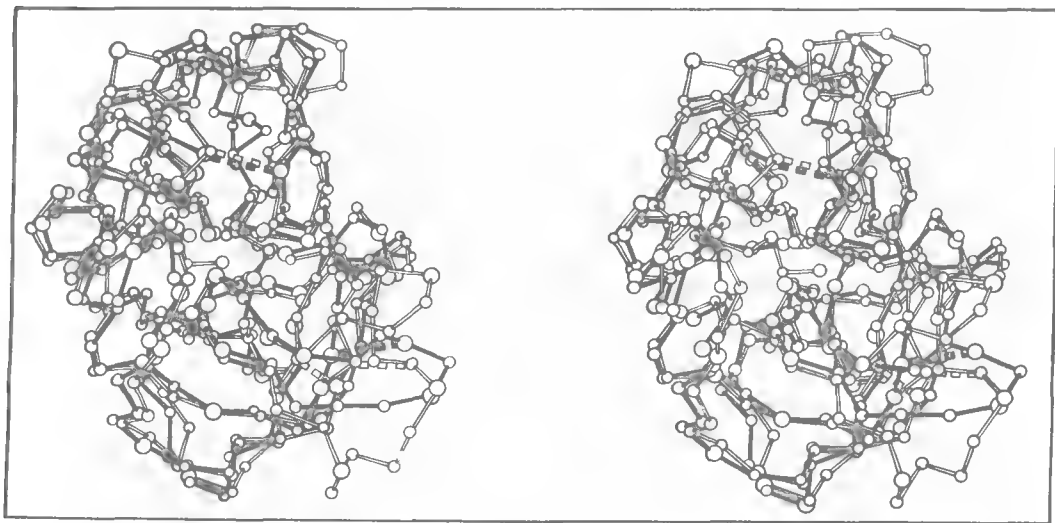


Рис.16. Стереопара, иллюстрирующая сходство третичных структур α -литической протеазы (тонкая линия) и протеазы А из *Streptomyces griseus* (жирная линия) [1257]

Значительно отличается от рассмотренных выше ферментов третичная структура субтилизинов BPN' и *Bacillus amylofaciens* [1248-1250]. У субтилизина семь α -спиральных сегментов, включающих каждый по 7-10 аминокислотных остатков. Кроме того, имеются шесть параллельных β -слоев и два антипараллельных. Последние проходят через всю глобулу и составляют основу гидрофобного ядра молекулы. Довольно большое число гидрофобных остатков в субтилизинах контактирует с окружающим растворителем.

Несмотря на существенные отличия в строении субтилизинов от строения других изученных сериновых протеаз, области, важные для катализа у всех ферментов этой группы, строение которых известно, весьма сходны (см. разд. 2.6). Структура сериновой D-аланилкарбоксипептидазы существенно отличается от таковой для типичных сериновых протеаз [1260]. Этот фермент построен из α/β -кластера и нескольких β -складчатых тяжей. В области остатка Ser37 расположен субстратсвязывающий центр, так что β -лактамное кольцо примыкает к гидроксильной группе серинового остатка.

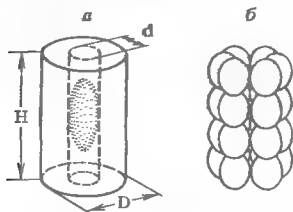


Рис.17. Схема строения мультিকаталитических протеиназ а - по данным электронной микроскопии. Размеры: D=11 нм, H=16 нм, d=4,3 нм; б - гипотетическая модель субъединичной организации [1298]

Следует упомянуть также данные электронной микроскопии мультикаталитических протеиназ. Оказалось [1298,1299] (рис. 17), что эти ферменты образуют цилиндрический комплекс диаметром 110 Å и высотой 160 Å, состоящий из четырех кольцевых образований.

2.5.2. Цистеиновые амидгидролазы

Из этой группы ферментов пространственная структура с достаточно высоким разрешением известна лишь для папаина (1,65 Å) и актинидина (1,7 Å). Оба фермента очень близки по своей пространственной организации. Оба они имеют четко выраженную двухдоменную структуру. У папаина домен L образуется остатками с 10 по 111 и с 208 по 212, а домен R – остатками с 1 по 9 и с 112 по 207, т.е. в оба входят как остатки N-концевой, так и C-концевой последо-

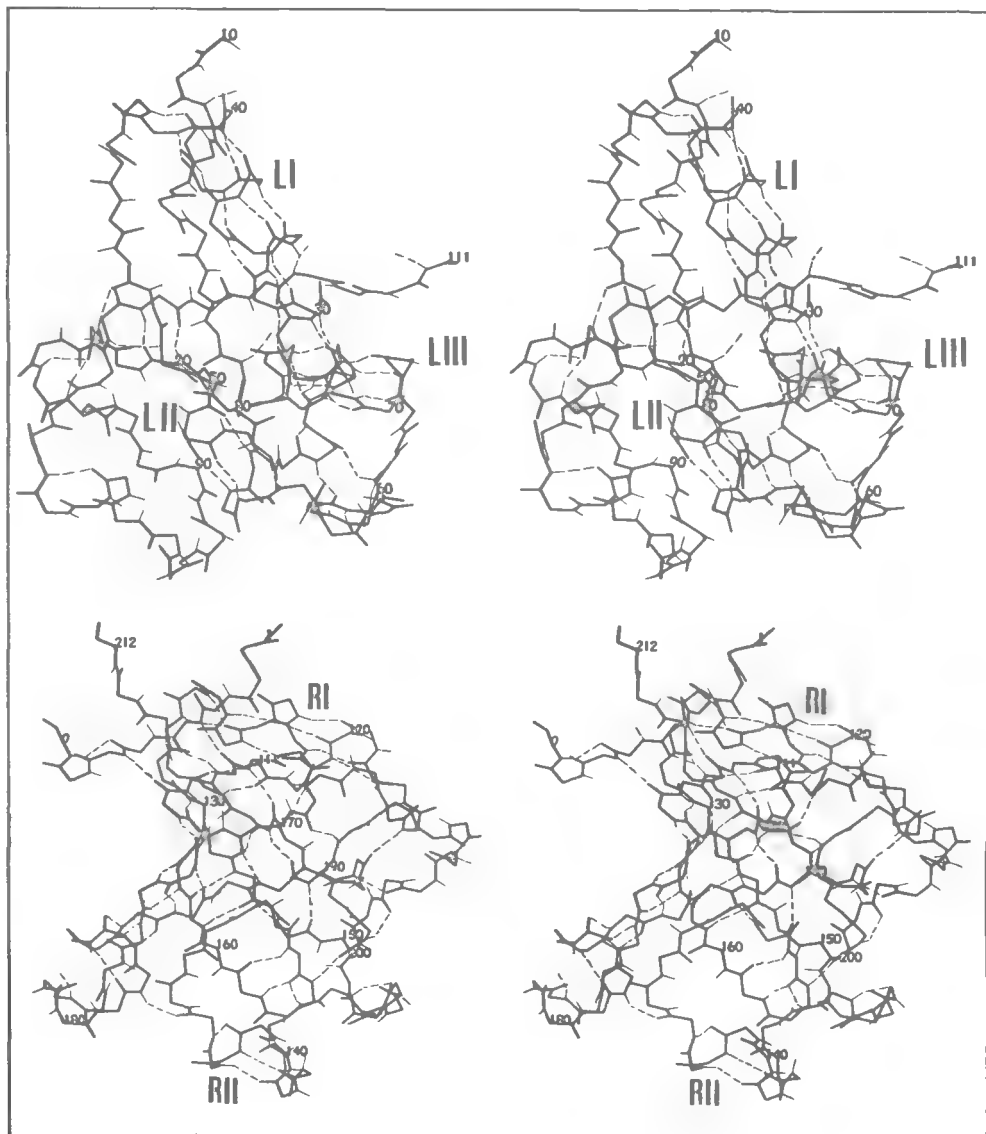


Рис.18. Стереорепрезентация доменов L (N-концевой) и R (C-концевой) папаина [1262]

Пунктирными линиями изображены водородные связи между атомами основной цепи

вательности. Оба домена имеют "ядра", образованные боковыми цепями неполярных остатков, тогда как поверхность их контакта образована в основном боковыми цепями полярных аминокислот и содержит значительное число молекул связанной воды. Из трех дисульфидных мостиков два (22-63 и 56-95) включены в домен L и один (153-200) – в домен R (рис.18). Вторичная структура папаина и актинидина относится к типу $\alpha+\beta$ (см. рис.10), причем домен L содержит преимущественно α -спиральные конформации, а домен R – в основном нерегулярные, скрученные β -слои. В папаине содержатся три спиральных участка (остатки 24-43, 50-57 и 67-78) в домене L и два спиральных участка (117-127 и 138-143) в домене R. Средняя длина водородных связей в спиральной структуре 2,98–2,99 Å, что выше, чем для идеальной α -спирали (2,87 Å).

Участок β -структуры домена R состоит в основном из четырех антипараллельных тяжей. Почти все остатки, входящие в β -структуру имеют двугранные углы $\langle\phi\rangle\sim 121^\circ$ и $\langle\psi\rangle\sim 143^\circ$, что характерно для правоскрученных β -складчатых листов. Все четыре центральных тяжа β -структуры погружены в область домена R. Они построены преимущественно из неполярных аминокислотных остатков, причем полярные остатки расположены на концах тяжей.

Как уже указывалось, каждый домен имеет гидрофобное ядро, образованное боковыми цепями неполярных остатков аминокислот. Это преимущественно остатки валина, лейцина и изолейцина. Что касается ароматических остатков, то они лежат в основном на периферии близко к ее поверхности или даже на поверхности так, что одна часть ароматического кольца контактирует с раствором. Практически не наблюдается ориентаций, типичных для π - π -взаимодействий.

Остатки заряженных аминокислот расположены на поверхности молекулы, однако они не образуют какого-либо участка с высокой концентрацией зарядов, а распределены достаточно равномерно. Одна основная заряженная группа (Lys181) и три кислых группы (Glu35, Glu50 и Glu52) погружены внутрь молекулы и недоступны растворителю. Заряды некоторых из этих групп (но не всех) нейтрализованы.

Интересно отметить, что как в актинидине, так и в папаине один из остатков пролина (Pro155) находится в *цис*-конфигурации.

2.5.3. Аспартатные амидгидролазы

Кристаллографический анализ с разрешением менее 3 Å был осуществлен для ряда аспартатных протеиназ животных, микроорганизмов и вирусов. Несмотря на заметные различия в последовательности аминокислот пепсина и ферментов из микроорганизмов, пространственно эти протеазы оказались очень сходными (см., например, рис.19). Характерным для этих ферментов является наличие, как и в случае цистеиновых протеаз, двухдоменной структуры. Более того, внимательное изучение хода полипептидной цепи в пепсине позволило [1300, 1301] внутри каждого домена выявить по два "субдомена" с повторяющейся пространственной организацией (рис.20). Это несомненно отражает процесс эволюции аспартатных протеаз, основным моментом которой является дубликация генов [1302, 1303].

Аспартатные протеазы практически целиком построены из β -структур. Имеется всего лишь четыре коротких участка деформированной α -спирали. У пеницил-

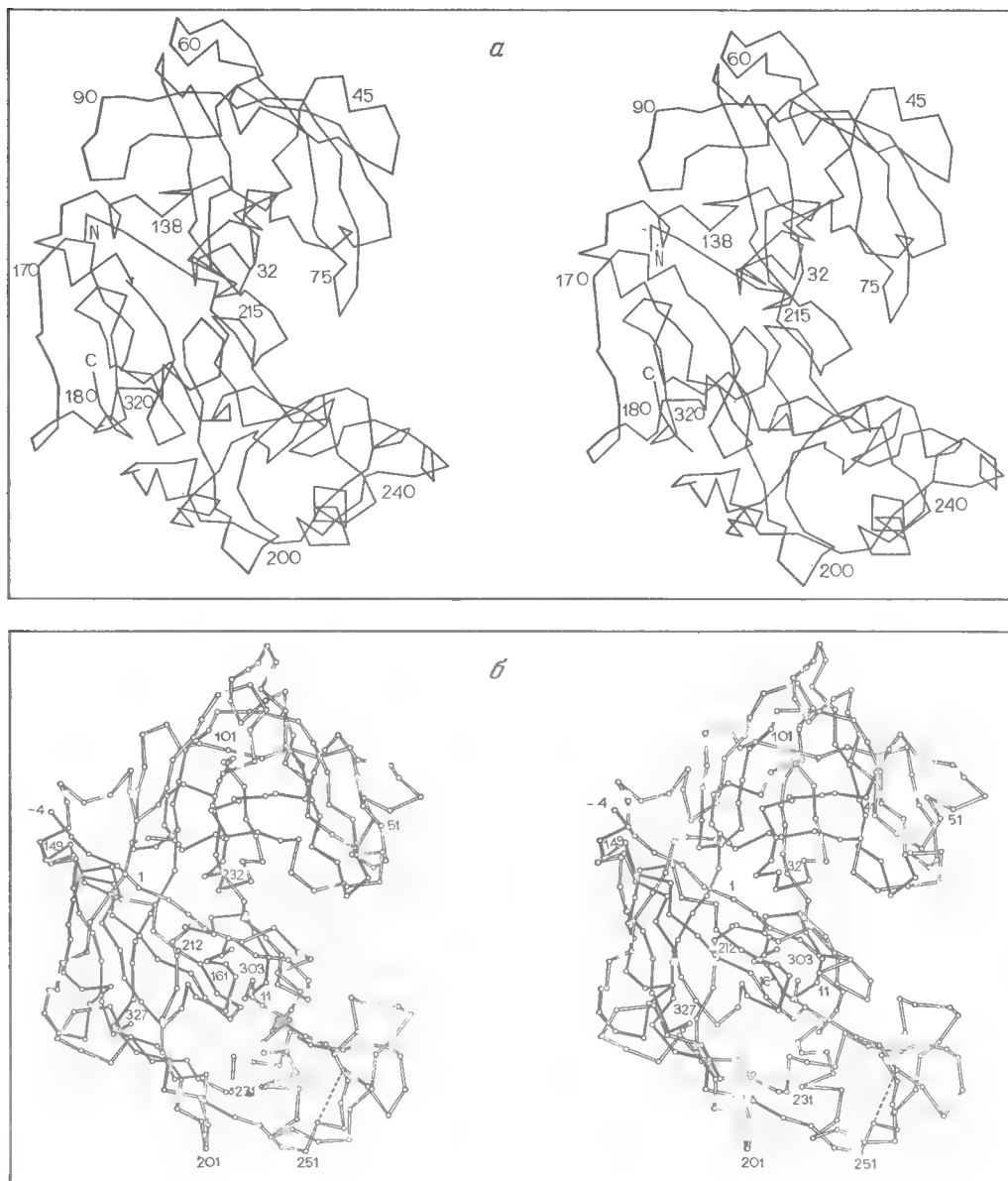


Рис.19. Стереопары хода полипептидных цепей пепсина свиньи (а) и пенициллы - пепсина (б) [1268,1276]

лопепсина это остатки 58-62, 137-141, 225-235 и 303-309 (нумерация по последовательности свиного пепсина). β -Структуры у этих ферментов образуются тяжами и "шпильками", соединенными короткими участками с неупорядоченной структурой. Каждый "субдомен" построен довольно однотипно: если двигаться от N-конца к С-концу молекулы, то сначала идет β -шпилька, затем - петля, далее - короткая спираль и снова β -шпилька с противоположной по сравнению с первой шпилькой ориентацией. В молекуле фермента эта структурная организация повторяется 4 раза. Ядро каждого домена образуется β -слоем, состоящим

из двух-широких петель, входящих одна в другую. В основном наблюдается удивительная симметричность доменов и молекулы фермента в целом.

Молекула ренина построена аналогичным образом. Среднее квадратичное отклонение атомов основной цепи от положения этих атомов в протеиназах микроорганизмов составляет $0,45\text{\AA}$ [275].

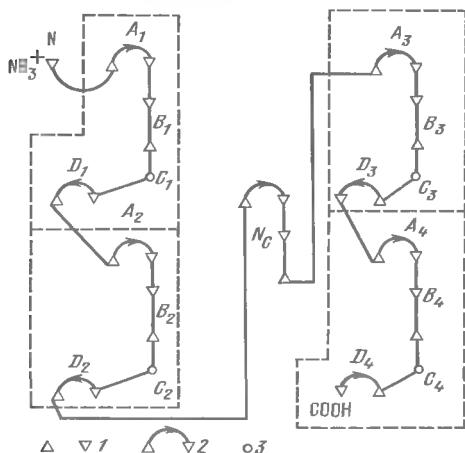


Рис. 20. Чередование вторичных структур в молекуле пепсина [1268]
1 — тяжи при рассмотрении с N- и C-концов; 2 — β -шпилька; 3 — α -спираль (пунктирной линией обведена структурная единица молекулы, которая повторяется 4 раза)

организмов составляет $0,45\text{\AA}$ [275].

Протеазы ретровирусов, хотя и являются аспартатными протеазами, имеют очень низкую степень гомологии первичной структуры с аспартатными протеазами животных и микроорганизмов. Их размеры обычно вдвое меньше, чем размеры типичных ферментов этой группы, однако активные формы ферментов представляют собой димер [939, 1304]. Структура димера очень сходна со структурой пепсина, особенно в области активного центра, образуемого группами двух протомеров. Вероятно, в стабилизации димера важную роль играют N- и C-концевые остатки молекулы протомера.

2.5.4. Металлсодержащие амидгидролазы

Из этой группы ферментов пространственная структура с разрешением около $1,6\text{\AA}$ известна для карбоксипептидазы A и термолизина. Более низкое разрешение достигнуто для карбоксипептидаз B и T и для нейтральной протеазы *Bacillus cereus*. Как уже отмечалось выше, в первичной структуре карбоксипептидаз и термолизина наблюдается очень мало сходства. Пространственные структуры этих ферментов также сильно различаются [1292]. Термолизин по классификации вторичных структур относится к группе $\alpha\beta$, а карбоксипептидаза A — к группе α/β . Оба фермента заметно отличаются даже по размерам молекул, хотя у них близкие молекулярные массы. Карбоксипептидаза A имеет почти сферическую симметрию ($50 \times 42 \times 38\text{\AA}$), тогда как термолизин представляет собой вытянутый эллипсоид ($64 \times 38 \times 37\text{\AA}$).

Термолизин — двухдоменный белок (рис. 21). N-Концевой и C-концевой домены соединены участком, включающим остатки 153–158. Каждый домен имеет почти сферическую симметрию. α -Спиральные структуры составляют около 38% всех аминокислотных остатков, причем большая часть спиральных участков расположена в C-концевом домене. Соответственно N-концевой домен построен преимущественно из β -складчатых слоев, включающих около 70 остатков. Эти слои, как и в α -химотрипсине, образуют "цилиндр". Граница двух доменов образована преимущественно гидрофобными боковыми цепями остатков Pro130, Leu133, Val139, Ile188, Val192, Leu202. Ряд заряженных боковых цепей расположен внутри молекулы, и их заряды компенсированы ионными взаимодействиями. Тер-

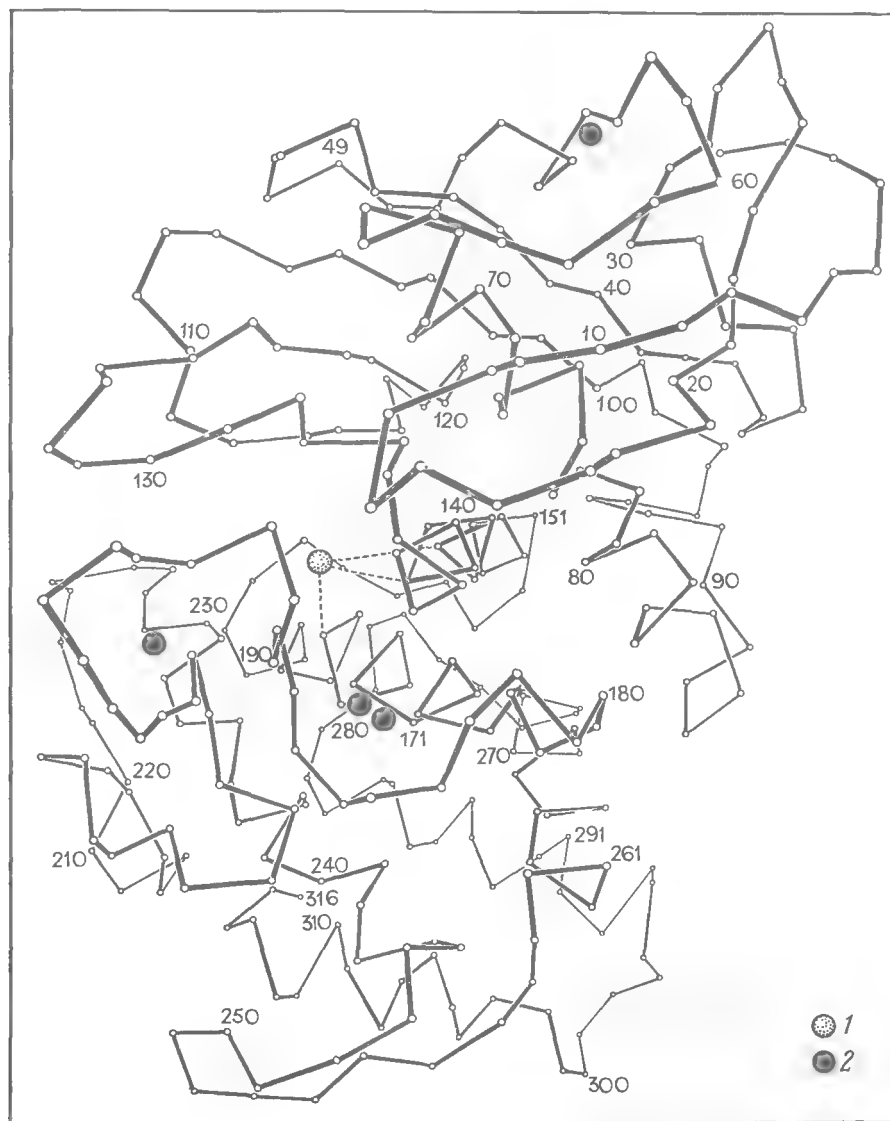


Рис.21. Конформация основной цепи термолизина [1291]

1 - атом Zn^{2+} ; 2 - атом Ca^{2+}

молизин характеризуется значительным содержанием солевых мостиков.

Термолизин содержит 3-4 атома кальция. Два атома кальция находятся всего лишь на расстоянии $3,8 \text{ \AA}$ один от другого. Образованные атомами Ca солевые связи включают остатки Asp57, Asp138, Asp185 и Asp200 и остатки Glu177, Glu190. Ближайший к атому Zn атом Ca находится от него на расстоянии $\approx 13 \text{ \AA}$. Два атома кальция, по-видимому, играют важную роль в стабилизации взаимного расположения двух доменов.

В отличие от термолизина карбоксипептидаза А (рис.22) - однодоменный белок. Общее содержание α -спиральных структур составляет 38%, а β -структур -



Рис.22. Ход полипептидной цепи карбоксипептидазы А [149]

17%. Таким образом, значительная часть белковой молекулы имеет неупорядоченную структуру.

В последовательности аминокислот белка спиральные участки чередуются с β -структурами и короткими неупорядоченными структурами. Лишь в средней части последовательности имеется значительный участок неупорядоченной структуры (остатки 122–174). Слои β -структуры организованы как в антипараллельные, так и в параллельные тяжи. Интересно, что пептидная связь между остатками Ser197 и Tyr198 имеет *цис*-конфигурацию.

Суммарно боковые цепи 164 остатков аминокислот карбоксипептидазы А экспонированы в раствор, 78 боковых цепей маскированы внутри глобулы и 65 расположены на поверхности молекулы, лишь частично контактируя с растворителем.

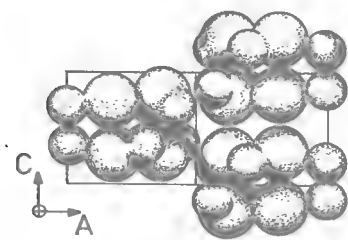


Рис.23. Модель субъединичной организации молекулы гексамера лейцинаминопептидазы почек свиньи [1306] Вид вдоль оси b

Что касается структуры нейтральной протеазы *Bacillus cereus*, то она довольно близка структуре термолизина (среднеквадратичное отклонение 0,88 Å), тогда как карбоксипептидазы В и Т по своей пространственной организации сходны с карбоксипептидазой А.

Следует упомянуть имеющиеся данные электронно-микроскопического изучения лейцинаминопептидаз из хрусталика глаза быка и почек свиньи [1305,1306]. Этот фермент, состоящий из 6 субъединиц, по-видимому, организован так, как это показано на рис.23.

2.6. Активные центры

Молекула субстрата или та часть субстрата, которая непосредственно взаимодействует с ферментом в ходе катализа, существенно меньше, чем молекула фермента. Поэтому все события, разыгрывающиеся при катализе, происходят в

ограниченной области фермента, называемой активным центром. Активный центр может быть определен как совокупность атомов фермента, участвующих в связывании и химическом превращении субстрата. Это определение, как и всякое, страдает неполнотой, поскольку очень трудно точно указать, какие атомы фермента участвуют в катализе и что означает само слово "участвуют". Кроме того, на разных стадиях каталитического превращения могут принимать участие разные атомы фермента. Вместе с тем все же можно достаточно определенно ограничить область активного центра в пространственной структуре большинства ферментов. В активном центре можно различить три участка: *каталитический* – совокупность атомов, взаимодействующих с расщепляемой группой субстрата; *связывающий* – участок, в котором происходит фиксация иных, чем реагирующая групп субстрата, и *регуляторный* – участок, взаимодействующий с внешними факторами и влияющий на состояние каталитического и связывающего участков. Значительная часть информации об активных центрах амидгидролаз получена методами направленной химической модификации и кинетическими методами, но наиболее подробные данные явились результатом рентгеноструктурного исследования комплексов ферментов с субстратоподобными лигандами. В последние годы для этой цели весьма успешно используется метод направленного мутагенеза [1307], позволяющий заменять одни остатки аминокислот на другие. Ниже будут изложены основные сведения, касающиеся активных центров представителей четырех групп протеиназ, а некоторые детали будут, приведены в последующих главах при рассмотрении отдельных стадий каталитического процесса.

2.6.1. Сериновые амидгидролазы

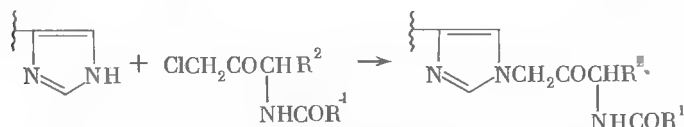
Характерным для этой группы ферментов является чувствительность к инактивации под действием диизопропилфторфосфата и других фосфорорганических соединений [1308]. Было установлено, что сериновые протеиназы взаимодействуют с диизопропилфторфосфатом, образуя фосфозфирную связь с единственной гидроксильной группой, принадлежащей остатку серина [1309]. В последовательности наиболее изученного фермента этой группы α -химотрипсина реакционноспособный остаток серина занимает положение 195 [1310, 1311]. Из различных ферментов группы сериновых протеиназ были выделены пептиды, содержащие реакционноспособный серин. Оказалось, что последовательность аминокислот в окружении этого остатка для многих ферментов этой группы весьма консервативна (см. табл. 14). Последовательность GlyAspSerGlyGlyPro сохраняется для всех панкреатических сериновых протеаз, протеаз крови, некоторых микробных протеаз и др. Такая же последовательность обнаружена у протеиназ и коллагеназ беспозвоночных [1312–1314]. Однако у ферментов бактерий типа субтилизина и грибных сериновых протеиназ последовательность в области остатка серина, модифицируемого фосфорорганическими соединениями, другая – GlyThrSerMetAla. Интересно, что близкое строение имеет пептид активного центра растительной протеазы кукумизина [1315] и трипептидилпептидазы II из эритроцитов человека [1316]. У подавляющего большинства сериновых протеаз консервативным является остаток Gly193, роль которого для активности фермента можно продемонстрировать на примере α -субъединицы фактора роста нервов [1317]. В ней, в отличие от протеолитически активной γ -субъединицы, этот остаток заменен на His и α -субъединица не активна. Известна также сериновая протеаза с уни-

кальной последовательностью SerSerGly [377].

Еще одну группу сериновых амидгидролаз, отличающуюся от всех рассмотренных выше, составляют *D*-аланинкарбоксипептидазы и β -лактамазы I, в активных центрах которых обнаруживается последовательность GlySerVal или Ala(Met)-SerMet(Thr) [257,258,1318,1319]. Остаток серина в этих ферментах реагирует с антибиотиками пенициллиновой группы [1320,1321].

Было показано также [1322], что при действии *n*-нитрофенилового эфира уксусной кислоты на α -химотрипсин ацилируется тот же самый уникальный остаток Ser195. Удалось выделить несколько относительно устойчивых производных α -химотрипсина и других сериновых протеиназ, ацилированных по Ser195 различными кислотами. Наконец, спектральные и кинетические исследования показали, что в ходе гидролиза эфиров ациламинокислот и их аналогов образуются относительно стабильные ацилпроизводные. Действие на сериновые протеиназы диизопропилфторфосфата и другие модификации по Ser195 полностью инактивируют фермент в отношении его каталитических функций. Таким образом, Ser195, или точнее его гидроксильная группа является важной для катализа и входит в активный центр фермента.

Другой каталитически важной группой является имидазольная группа остатка His57 (в последовательности α -химотрипсина). Указания на важность этой группы были получены при исследовании pH-зависимости катализа сериновыми протеазами: была обнаружена группа с $pK_a \approx 7$, функционирующая в непротонированном состоянии. В дальнейшем удалось найти специфические соединения, реагирующие с остатком His57. Ими оказались галлоидкетоны, производные ациламинокислот и пептидов [1323]:



Эти соединения полностью инактивировали сериновые протеазы. Последовательность аминокислот вблизи остатка His57 также оказалась весьма консервативной для большого числа ферментов этой группы.

Значение остатка His57 было выявлено также при метилировании $N^{\epsilon 2}$ -атома имидазольной группы этого остатка метиловым эфиром *m*-нитробензолсульфокислоты [1324]. Оказалось [1325,1326], что *N*-метилхимотрипсин практически лишен каталитической активности, но сохраняет способность связывать субстраты. Таким образом, модификация затрагивает каталитический, но не связывающий участок активного центра.

Дальнейшие успехи в установлении строения активных центров сериновых протеаз обусловлены главным образом результатами рентгеноструктурного анализа. Было установлено, что гидроксильная группа Ser195 и имидазольное кольцо His57 расположены в α -химотрипсине вблизи поверхности молекулы в области низкой электронной плотности. Эта область в молекулах ацилированных по Ser195 производных (или тозиллированном производном) занята боковой цепью (обычно ароматической группой) ацильного остатка и носит название "тозильная яма". $N^{\epsilon 2}$ -Атом остатка His57 расположен довольно близко к $O\gamma$ -атому остатка Ser195.

В ходе кристаллографических исследований было установлено, что $N^{\delta 1}$ -атом

His57 взаимодействует с карбоксильной группой остатка Asp102 (ранее считавшейся остатком аспарагина). Близкое расположение трех функциональных групп Asp102, His57 и Ser195 позволило сформулировать гипотезу активации гидроксильной группы Ser195 путем переноса протона на Asp102 по так называемой цепи переноса заряда [1327]:



В дальнейшем концепция цепи переноса заряда в нативном ферменте подвергалась критике и в настоящее время ставится под сомнение многими исследователями (подробнее см гл.7.).

Исследование кристаллов стабильных O-ацилпроизводных α-химотрипсина позволило обнаружить взаимодействие карбонильного кислорода ацильной группы с NH-группами остатков Ser195 и Gly193 в основной цепи фермента. Эти группы образуют так называемую оксианионную полость [1328]. Наконец, исследование модифицированных по His57 пептидными хлорметилкетонами кристаллов γ-химотрипсина дало возможность идентифицировать [1329,1330] группы фермента, входящие в субстратсвязывающий участок. Это полипептидная цепь остатков 214-216, с которыми пептидный субстрат образует, по-видимому, антипараллельную β-структуру.

На рис.24 представлена модель расположения атомов в активном центре

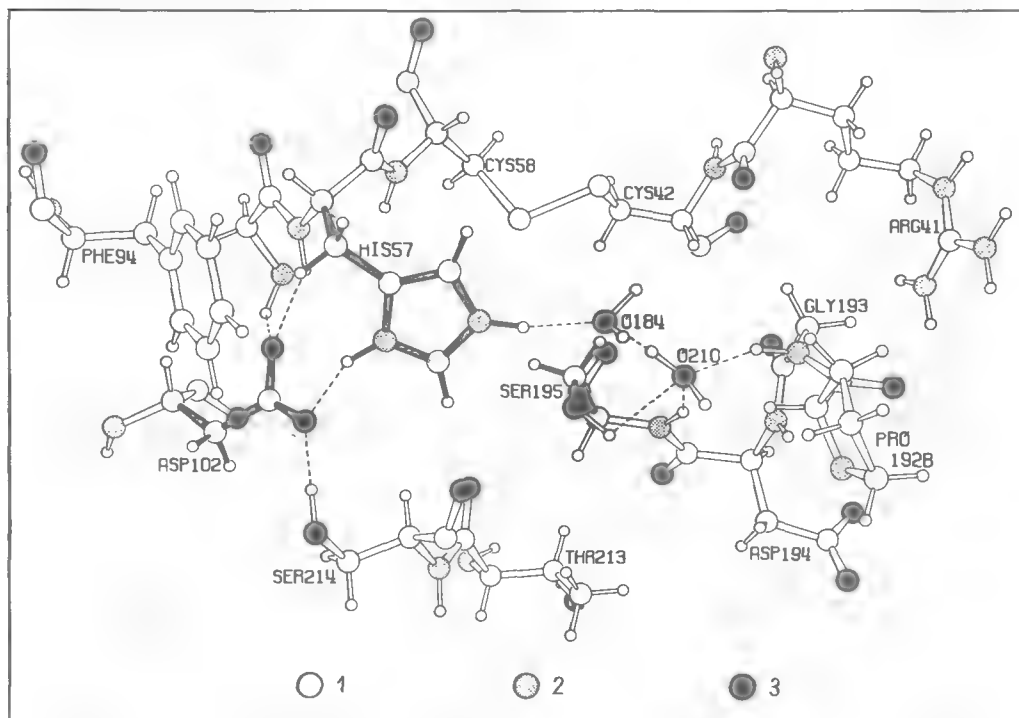


Рис.24. Область активного центра протеазы A из *Streptomyces griseus* [1254] Пунктиром показаны водородные связи; Q - молекула воды; 1- углерод, 2- азот, 3- кислород

близкого аналога α -химотрипсина – протеазы А из *Streptomyces griseus*, для которой рентгеноструктурные данные были получены с высоким разрешением (1,5 Å). Эта модель практически не отличается от модели для α -химотрипсина, полученной с разрешением 1,68 Å.

"Тозильная яма" – участок связывания боковой цепи субстратной аминокислоты, образующей своей карбоксильной группой расщепляемую связь – представляет собой довольно узкую щель, размеры которой таковы (12×6,5×4 Å), что в ней может разместиться ароматический остаток фенилаланина, тирозина или триптофана. Этот участок активного центра образован преимущественно боковыми цепями неполярных аминокислот и пептидными связями основной цепи (190–191, 191–192 и 215–216). В глубине "ям" расположены важные остатки, определяющие специфичность фермента. Это остаток Ser189 в α -химотрипсине и остаток Asp189 в трипсине. Остатки Gly216 и Gly226 в химотрипсине и трипсине индифферентны в отношении связывания субстрата, но у эластазы, специфичной к неполярным аминокислотным остаткам с короткой боковой цепью, в этих положениях имеются остатки Val216 и Thr226, препятствующие вхождению в полость объемистых боковых цепей субстрата. "Тозильная яма" в α -химотрипсине и родственных ферментах экранирована от окружающей среды боковой цепью остатка Met192.

Участки активного центра сериновых протеаз, ответственные за связывание С-концевого фрагмента субстрата (уходящей группы), были идентифицированы при изучении комплексов трипсина и химотрипсина с природными белковыми ингибиторами сериновых протеаз. Такими участками являются дисульфидная связь 42–58 (химотрипсин), область рядом с остатками His40 и Gly193, а также остаток Tyr151 (в трипсине).

Важное значение для активности сериновых протеаз имеет ионная пара, образуемая в ферменте карбоксилат-ионом Asp194 и аммонийной группой Ile16. Эта ионная пара может рассматриваться как регуляторный участок фермента. Она отсутствует в зимогенах и образуется при активации последних. При этом, как полагают, происходит окончательное формирование активного центра фермента. Изменение pH в щелочную область приводит к разрушению ионной пары и переходу фермента в новую, неактивную конформацию.

Описанное выше строение активных центров сериновых протеиназ характерно с небольшими вариациями для всех изученных ферментов этой группы. Показательно в этом отношении состояние активного центра в субтилизинах и других микробных сериновых протеиназах. Как уже отмечалось, отсутствует гомология в первичной структуре субтилизинов и панкреатических ферментов. Отсутствует также сходство в пространственной структуре в целом. Однако строение активных центров у этих двух типов сериновых протеиназ очень сходное. Основные различия химотрипсина и субтилизина заключается в том, что "тозильная яма" в первом случае представляет собой узкий карман, в котором положение ароматической группы субстрата жестко фиксировано. Во втором случае аналогичный участок представляет собой щель, с одной стороны доступную растворителю. Таким образом, ароматическое кольцо субстрата в комплексе с субтилизином взаимодействует с ферментом лишь одной стороной [1330].

Другое отличие заключается в отсутствии у субтилизинов кислого остатка

гомологичного Asp194 в химотрипсине. Соответственно N-концевые последовательности этих ферментов отличаются от последовательностей сериновых протеаз животных.

2.6.2 Цистеиновые амидгидролазы

Представители этой группы ферментов инактивируются реагентами, взаимодействующими с тиоловыми группами – *p*-хлормеркурибензоатом [1331], йодацетатом и йодацетамидом [1332] и т.п. Было показано, что при инаktivации реагирует одна SH-группа остатка Cys25 [1333] (нумерация последовательности папаина). Этот остаток локализован у большинства ферментов животных (калпаины, катепсины В, L и др.) и растений (папаин, актинидин, химопапаин и др.) в последовательности Gly-Хаа-Cys-Trp, где Хаа – разные для разных ферментов остатки. У микробных цистеиновых протеаз (стафилококковой протеазы, клострипаина) эта последовательность несколько отличается [720, 726, 728, 735, 747, 752, 1334–1336]. Рентгеноструктурный анализ папаина и актинидина показал, что этот остаток расположен в протяженной щели на границе двух доменов фермента (рис. 25). Он может быть превращен в дегидроаланиновый или глициновый остаток с полной потерей активности [1337]. В непосредственной близости к SH-группе располагается имидазольная группа остатка His159, N^{δ1}-атом которого образует с SH-группой Cys25 водородную связь. Второй N^{ε2}-атом His159 образует водородную связь с O^{δ1}-атомом остатка Asn182. Эта водородная связь расположена в неполярном окружении и защищена от контакта с растворителем индольным кольцом Trp184. Роль остатка His159 в катализе первоначально ставилась под сомнение, поскольку рН-зависимость катализа показывает участие непротонированной группы с рK_a 4,2. Это значение рK_a приписывалось карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты. Однако кристаллографические данные показали, что ближайшая к Cys25 карбоксильная группа (Asp158) находится от SH-группы на расстоянии ≈ 7,5 Å. По-видимому, низкое значение рK_a гистидина обусловлено взаимодействием с тиолат-ионом Cys25.

Хотя существует формальная аналогия между системой Asn182-His159-Cys25 и системой переноса заряда в химотрипсине (Asp102-His57-Ser195), очевидно, что у цистеиновых протеиназ такая система отсутствует и роль связи Asn182-His159 заключается в фиксации положения имидазольного кольца гистидина.

В активном центре цистеиновых протеиназ расположена также боковая цепь остатка Gln19. Ее O^{ε1}-атом образует водородную связь с O^γ-атомом остатка Ser183.

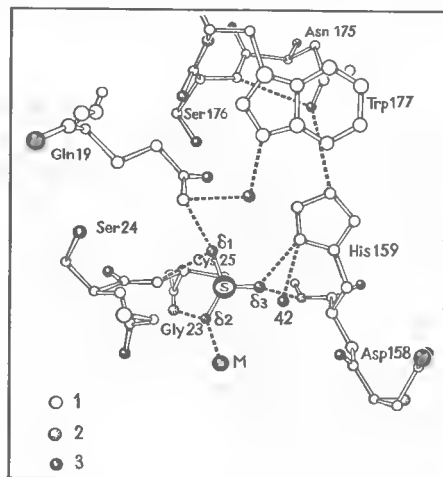


Рис. 25. Область активного центра папаина [1262]

Пунктиром показаны водородные связи. М – метанол (кристаллизационный), 42 – молекула воды, 1 – углерод, 2 – азот, 3 – кислород

Окружающие активный центр боковые цепи неполярных аминокислот образуют связывающий субстратный участок. Довольно глубокий "карман", удаленный от каталитически активных групп настолько, что он, по-видимому, связывает второй (P_2) от расщепляемой группы остаток субстрата (в сторону N-конца), образован боковыми цепями Tyr67, Pro68 и Val133 и Val157 второго домена.

Глубина щели активного центра по оценкам, сделанным с помощью спин-меченных производных папаина [1338] составляет около $10 \text{ \AA}$. В фичине эта величина несколько меньше ($\approx 8 \text{ \AA}$) [1339].

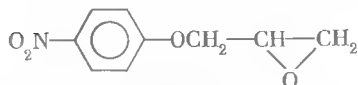
В цистеиновых протеиназах не обнаружено групп, которые могли бы играть регуляторную роль, подобную той, какую выполняют остатки Asp194 и Ile16 в α -химотрипсине.

2.6.3. Аспартатные амидгидролазы

Аспартатные амидгидролазы функционируют в кислой или слабокислой среде, и поэтому, естественно, было ожидать, что в качестве каталитически активных групп у этих ферментов выступают карбоксильные группы, практически единственные в белках, способные ионизироваться в этих условиях. Действительно, было обнаружено [1340,1341], что некоторые реагенты на карбоксильные группы полностью инактивируют аспартатные протеазы. К таким реагентам относятся diazoкетоны – производные ациламинокислот и пептидов [1342,1343], а также некоторые эпоксисоединения [1344]. Диазокетоны в присутствии солей меди реагируют с одной и вполне определенной группой в пепсине – карбоксильной группой остатка Asp215. Реакция идет, по-видимому, через образование карбена, который и является реакционноспособной частицей (см. гл.5).

Анализ последовательности аминокислот вблизи модифицируемой группы у разных аспартатных протеиназ показал значительную консервативность этого участка (см. табл.16).

Эпоксисоединения, например *n*-нитрофеноксипропилоксид



реагируют с другой карбоксильной группой, принадлежащей в последовательности пепсина остатку Asp32 [1344]. Кроме того, этот реагент в определенных условиях реагирует также с остатком Asp215, присоединяясь своей вторичной гидроксильной группой [1345]. Последовательность остатков в области Asp32 также весьма консервативна. Обращает на себя внимание сходство в последовательностях пептидов в области Asp32 и Asp215, что, по-видимому, обусловлено эволюционными особенностями аспартатных протеиназ, о которых говорилось выше.

Оба каталитически важных остатка Asp32 и Asp215 расположены в глубине протяженной щели, образованной двумя доменами белка и пересекающей практически всю глобулу (рис. 26). Карбоксильные группы этих остатков расположены близко одна от другой и образуют между собой водородную связь. Остаток Asp32 погружен в глобулу белка и образует водородные связи с OH -атомом остатка Ser35, NH -группой остатка Gly34 в основной цепи и с молекулой воды.

Карбоксильная группа Asp215 находится в весьма сходном окружении. Она образует, кроме связи с Asp32, еще и водородные связи с O^γ-атомом остатка Thr218, NH-группой остатка Gly217 и той же молекулой воды. Эта молекула воды (у пепсина N355) лежит между двумя карбоксильными группами активного центра в плоскости группы Asp215. Вблизи этих групп имеются еще по крайней мере две молекулы воды, одна из которых, по-видимому, играет важную роль в катализе (см. гл.7). Из других функциональных групп белка, расположенных в области активного центра, следует отметить COOH-группу Asp304, образующую H-связь с пептидным карбонилем основной цепи остатка Thr216, ионную пару, образованную остатками Lys308 и Asp11, и гидроксильную группу остатка

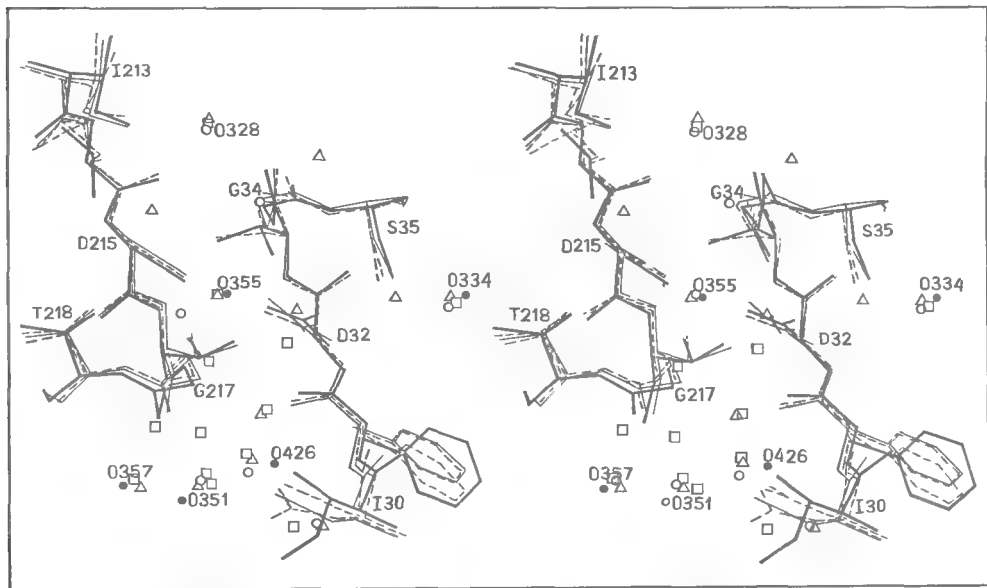


Рис.26. Активные центры четырех аспартильных протеаз, наложенные один на другой (стереоизображение)
Жирные линии - пепсин, ● - вода; тонкие линии - пенициллопепсин, Δ - вода; короткий пунктир - ризопуспепсин, □ - вода; длинный пунктир - эндотиапепсин, ○ - вода [1270]

Tyr75. Остаток Tyr75 расположен в петле, частично прикрывающей щель активного центра. При повороте вокруг связи C_α-C_β гидроксильная группа этого остатка приближается с карбоксильными группами остатков Asp215 и Asp32.

В области активного центра расположены боковые цепи остатков Phe189 (в пенициллопепсине или Tyr189 в пепсине), Ile213 и Tyr299 (в пепсине Leu299), которые могут формировать гидрофобные связывающие участки фермента.

Значительно отличающаяся от рассмотренных выше ферментов - протеаза *Scytalidium lignicolum*, нечувствительна к большинству специфических ингибиторов аспаратных протеаз. В активном центре этого фермента функционирует остаток глутаминовой кислоты [1346]. Интересно, что последовательность аминокислот вблизи этого остатка гомологична последовательности в области активных центров других аспаратных протеаз:

протеаза В:	CysGlnThrAlaIleLeuGluThrGlyPhe
пепсин:	(32) PheThrValIlePheAspThrGlySer
	(215) AlaIleLeuAspThrGlyThr

Наконец, следует упомянуть протеазы ретровирусов, которые, как указывалось, в димерном состоянии функционируют по типу аспартатных протеаз. Роль каталитически активного остатка у протеазы вируса иммунодефицита человека играет остаток Asp25. По-видимому, при димеризации этот остаток в каждом из протомеров занимает положение, соответствующее остаткам Asp32 и Asp215 в пепсине [1347].

2.6.4. Металлсодержащие амидгидролазы

Изученные в отношении структуры активного центра ферменты этой группы содержат связанные с белком атомы цинка. Несмотря на большие различия первичной структуры и пространственного строения двух основных представителей Zn-зависимых протеаз – карбоксипептидазы А и термолизина, строение их активных центров очень сходно [1348,1349].

Ион Zn^{2+} в карбоксипептидазе и термолизине имеет четыре координационные связи. Из них три образованы с функциональными группами белковой молекулы и одна – с молекулой воды. В координационной сфере металла в обоих случаях имеется по два остатка гистидина и по одному остатку глутаминовой кислоты. Однако взаимное расположение этих остатков в карбоксипептидазе А и термолизине разное (табл.19).

Наряду с группами, непосредственно входящими в координационную сферу атома Zn, имеются группы, ориентирующие имидазольные кольца двух лигандов по отношению к атому цинка (рис.27). Эти группы различны у карбоксипептидазы и термолизина. Далее в непосредственной близости от атома цинка ($\approx 4,2-4,9 \text{ \AA}$) расположены остатки глутаминовой кислоты, которым приписывается роль акцепторов протона в катализе.

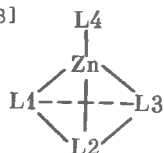
Вблизи атома цинка в карбоксипептидазе имеется гидрофобный "карман", образованный боковыми цепями остатков Tyr192 и Phe279. В непосредственной близости от него расположена гуанидиновая группа остатка Arg145 и фенольная группа остатка Tyr248 [149].

В термолизине область, расположенная вблизи атома цинка, является более протяженной, чем в карбоксипептидазе. Она образуется ароматическими остатками Trp115 и Phe114, а также группой гидрофобных боковых цепей Val139, Leu133, Phe130, Leu202 и Val192. Наиболее существенное отличие этого фермента от карбоксипептидаз заключается в том, что в активном центре его расположен остаток гистидина (His231), по-видимому, играющий важную роль в катализе. Этот остаток своим $N^{\delta 1}$ -атомом связан с карбоксильной группой остатка Asp226, что в известной степени напоминает ситуацию у сериновых протеаз.

Как и в карбоксипептидазе, в активном центре термолизина расположена боковая цепь остатка аргинина (Arg203).

Дипептидилкарбоксипептидаза I (ангиотензин I-превращающий фермент) имеет последовательность в области каталитически важных остатков His и Glu весьма

Таблица 19. Лиганды атома цинка [1348]



Фермент	Функция	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Протоно-акцепторная группа
Карбокси-пептидаза А	Лиганд Ориентирующая группа	His196 (N ^{δ1}) Ser194	Glu72	His69 (N ^{δ1}) Asp 142	H ₂ O	Glu270
Термолизин	Лиганд Ориентирующая группа	His142 (N ^{ε1}) Asp170	His146 (N ^{ε1}) Asn165	Glu 166	H ₂ O	Glu143

сходную с термолизиним. У этого фермента есть два потенциальных Zn-связывающих центра, расположенных в разных доменах молекулы, однако фермент способен связывать лишь 1 г-атом Zn/моль белка [1350]. Последовательность в области каталитически активного остатка Glu в ангиотензинпревращающем ферменте имеет значительно большее сходство с последовательностью карбоксипептидазы А (вблизи Glu270), чем с термолизиним [1351].

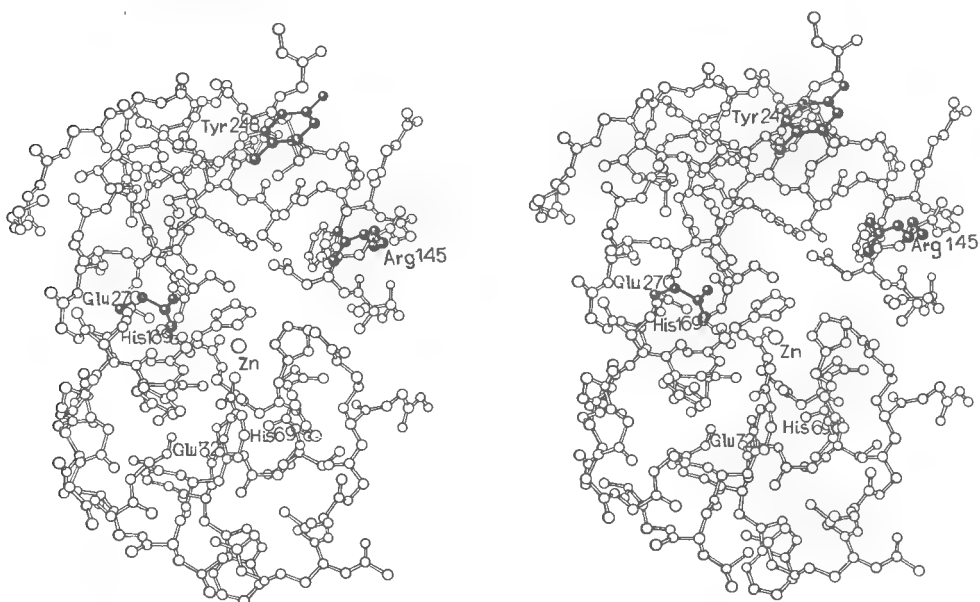


Рис.27. Стереизображение области активного центра карбоксипептидазы А [149]

Атомы С боковых цепей каталитически важных остатков Arg145, Tyr248 и Glu270 (●); атомы С, N и O основной цепи (○)

Важные для катализа остатки глутаминовой кислоты обнаружены методами химической модификации и направленного мутагенеза в нейтральной протеазе *Aeromonas* sp. [1352] и эндопептидазе "24.11" [1353]. В активном центре лейцинаминопептидазы в связывании иона Zn^{2+} , по-видимому, участвует SH-группа остатка цистеина [1354,1355] (см., однако: [1356]).

2.6.5. Сходство и различия в структуре активных центров ферментов, относящихся к разным группам

Как видно из изложенных выше данных, внутри каждой группы ферментов наблюдается очень большое сходство в строении активных центров. Это сходство проявляется даже у ферментов, первичные и общие пространственные структуры которых заметно различаются. Различия в строении активных центров внутри группы связаны в основном с различиями в их специфичности. Не следует, однако, забывать, что эти выводы базируются на данных по исследованию очень небольшого числа представителей каждой группы ферментов.

Представляет интерес вопрос о сходстве и различиях в структуре активных центров ферментов, относящихся к разным группам.

Такое сравнение между сериновыми и тирозовыми протеазами [1357], сериновыми и металлсодержащими [1348] и аспартильными и металлсодержащими [1358] ферментами выявляет определенное сходство в геометрии всех четырех групп амидгидролаз или по крайней мере их представителей, изученных методами рентгеноструктурного анализа. Отмечена также близость в расположении групп активных центров трипсина и термолизина с группами фосфолипазы A_2 [1359].

Как видно из табл.20, наложение структур активных центров химотрипсина и папаина приводит к различиям в положении функционально важных атомов, не превышающим 1 Å.

Таблица 20. Расстояние в активных центрах химотрипсина и папаина при наложении структур [1357]

Химотрипсин			Папаин			Расстояние, Å
His	57	N ^{δ1}	His	159	N ^{ε2}	0,4
His	57	N ^{ε2}	His	159	N ^{δ1}	0,8
Asp	102	C ^γ	Asn	175	C ^γ	0,9
Asp	102	O ^{δ1} /O ^{δ2}	Asn	175	O ^{δ1} /N ^{δ2}	0,7
Ser	195	O ^γ	Cys	25	S ^γ	1,0

Таблица 21. Сравнение положения эквивалентных групп в трипсине и термолизине [1348]

Группа	Трипсин			Термолизин			Расстояние, Å
Нуклеофил	Ser	195	O ^γ	OH ₂ -Zn			0,6
Анионный центр	Gly	193	NH	Zn			2,1
Акцептор протона	His	57	N ^{ε2}	Glu	143	O ^{ε2}	2,1

Сравнение положения эквивалентных по функциям атомов и групп в трипсине и термолизине (комплексы с квазисубстратами) показывает, что активные центры этих двух ферментов заметно различаются (табл.21).

Протонакцепторные группы, соответственно His57 и Glu143, хотя и отличаются по положению, но располагаются по одну сторону от участка, предположительно занимаемого гидролизуемой связью.

2.6.6. Структура активных центров протеаз в кристаллах и растворе

В какой мере данные, полученные в результате рентгеноструктурного анализа ферментов, отражают структуру их в растворе? К сожалению, сейчас нет методов, позволяющих определить пространственное положение атомов белка в растворе с достаточной точностью. Те физико-химические методы, которые применяются для характеристики белковой молекулы, или имеют слишком низкое разрешение, или дают суммарные данные, которые трудно связать с конкретными атомами и группами белка. Поэтому поставленный выше вопрос до сих пор не может считаться решенным [1360].

Известно, однако, что выводы, получаемые на основе анализа строения кристаллов, как правило, хорошо согласуются со свойствами белков в растворе. Отсюда следует, что в большом числе случаев белок при кристаллизации не претерпевает существенных структурных изменений.

Расхождения могут возникать в следующих случаях: 1) если кристаллизация происходит в условиях, далеких от условий, в которых фермент проявляет активность; 2) если в растворе существует равновесие между несколькими формами белка, различающимися по биологической активности и по способности к кристаллизации; 3) если кристаллическая упаковка сильно искажает структуру молекулы.

Так, кристаллы химотрипсина, использовавшегося для рентгеноструктурного анализа, были получены при pH 4,5, т.е. в условиях, когда фермент практически неактивен в отношении типичных субстратов. Однако было показано [1361], что в этих условиях скорость распада ацилированных по Ser195 производных химотрипсина в кристаллах и в растворе одинакова.

Примером взаимопревращаемых форм фермента в растворе служат α - и γ -химотрипсины, образующиеся при кристаллизации в разных условиях [1362]. Эти формы в растворе очень медленно превращаются одна в другую. α -Химотрипсин несколько отличается по свойствам от γ -формы [1363]. Таким образом, α - и γ -химотрипсины в растворе, по-видимому, имеют несколько различающуюся структуру. В то же время сравнение третичной структуры кристаллов этих форм химотрипсина [1227,1364] не выявило какой-либо существенной разницы между ними. Следует, однако, отметить, что согласно последним данным [1228] γ -химотрипсин возможно является комплексом (или ацилферментом) белка с тетрапептидом.

Исследование ^{15}N -ЯМР-спектров α -литической протеазы в растворе и в твердом состоянии не обнаружило каких-либо существенных различий этих двух состояний фермента [1365].

Наиболее драматическим примером различий структуры фермента в кристалле и растворе является карбоксипептидаза А. Уже после появления рентгеноструктурных данных выяснилось, что: 1) характер кинетических зависимостей карбоксипептидазы А в кристалле и растворе различен [1366,1367]; 2) различно и окружение хромофорных меток, введенных в Туг248 в кристалле и растворе [1368-1370].

Причина этих различий, вероятно, в том, что использованные для рентгеноструктурного анализа кристаллы карбоксипептидазы А имели необычную форму и кристаллографические характеристики [1371]. Было показано также, что конформации карбоксипептидазы В различаются в кристалле и растворе [1372]. Подобное положение отмечалось и для ферментов других классов (см., например: [1373]).

Таким образом, нельзя быть *a priori* уверенным, что найденная конформация белка в кристалле отвечает положению, которое существует для этого белка в растворе. В каждом случае этот вопрос должен быть подвергнут специальному анализу. Многообещающая возможность в этом отношении открывается в связи с применением синхротронного излучения в кристаллографии белков, что позволяет изучать реакции в кристаллах в миллисекундном интервале времени [1374].

2.7. Конформационная подвижность ферментов

Известны многочисленные данные, свидетельствующие о подвижности групп в белковых молекулах и многообразии конформационных состояний белков в целом (см. обзоры: [1375-1379]). Во многих случаях изменение конформации происходит при изменении внешних условий (рН, температура и т.п.) или же при присоединении лигандов. Однако и при фиксированных условиях белки, по-видимому, существуют в нескольких или многих состояниях, взаимопревращения между которыми происходят достаточно быстро. Это следует, во-первых, из экспериментов по изотопному обмену протонов в белках, выявляющему наряду с быстрой стадией обмена также и более медленную стадию, которую относят к обмену протонов внутри глобулы, скорость которой лимитируется скоростью конформационного изменения белка [1380]. Во-вторых, такие изменения можно проследить, используя "репортерные группы", введенные в белок, и исследуя спектральные или иные физико-химические изменения, происходящие с белком. Например, в случае модифицированной карбоксипептидазы удалось обнаружить рН-независимый конформационный переход с кажущейся константой скорости около 5 с^{-1} [1381]. Далее конформационная подвижность в белках прослеживается методами ядерного магнитного резонанса высокого разрешения [1382] по положению и форме сигналов от отдельных атомов и групп. Существует много других способов констатации конформационных изменений в белках [1383-1385], рассматривать которые здесь не представляется возможным. Единственно хотелось бы упомянуть о принципиальной возможности априорного расчета относительно небольших белковых молекул, дающего сразу сведения об энергиях большого набора состояний белка и, следовательно, о его конформационных возможностях [153,1386], а также о возможности компьютерного моделирования подвижности белков методами молекулярной динамики [1387,1388].

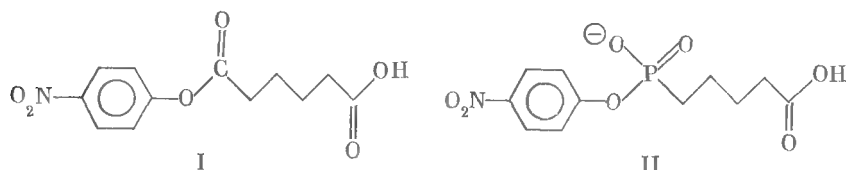
2.8 Протеолитическая активность иных, чем амидгидролазы, ферментов.

Каталитически активные антитела

Способность катализировать гидролиз амидной связи была выявлена у ферментов подклассов 3.1 и 3.2, а именно у лизоцима [1389,1390] и холинэстераз [1391,1392]. Протеолитическая активность лизоцима может быть причиной артефактов при выделении микробных белков путем лизиса клеточной стенки бактерий этим ферментом.

В 1987 г. одновременно двумя группами исследователей была открыта способность некоторых специально полученных антител катализировать гидролитические и другие реакции [1393,1394].

Метод получения таких антител заключается в иммунизации животных так называемыми аналогами переходных состояний субстратов (см. гл.5). Например, для эфиров типа I такими аналогами служат фосфонаты II [1395]:



Удастся найти клоны, продуцирующие антитела, активные в отношении гидролиза соответствующих эфиров и проявляющие свойства, близкие к ферментам. В частности, они обладают определенной стереоспецифичностью, способны осуществлять синтез амидной связи [1396,1397]. Каталитическая активность таких антител достигает шести порядков [1398]. Получены антитела с искусственно введенными имидазольными группами [1399] (см. обзор: [1400]).

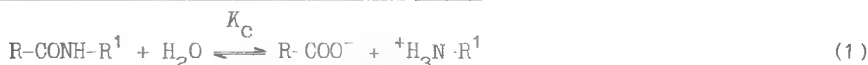
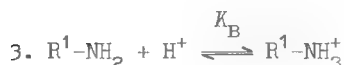
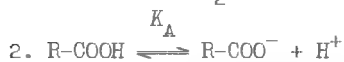
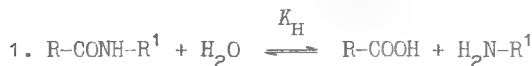
2.9. Заключение

Гидролиз амидной связи катализируется многочисленными ферментами, разнообразие свойств и строения которых очень велико. Несмотря на такое разнообразие, большинство, если не все ферменты этого класса, можно свести к четырем основным группам, отличающимся структурой каталитического аппарата и, по-видимому, механизмом каталитического действия. В каждой группе можно выделить несколько подгрупп, ферменты которых заметно отличаются по своей первичной и пространственной структуре от ферментов других подгрупп той же группы. Однако в области активного центра, насколько можно судить по имеющимся сравнительно немногочисленным данным, сходство остается еще весьма высоким. Более того, можно отметить определенные общие черты структуры ферментов, относящихся к разным группам. Все это, по-видимому, отражает единство функции амидгидролаз. Наблюдаемые отличия связаны, с одной стороны, с эволюционной предисторией данного типа ферментов, а с другой – с особенностями структуры субстратов этих ферментов. Поскольку структура самой расщепляемой амидной связи мало зависит от строения остальной части молекулы субстрата, важнейшие особенности катализа реакции гидролитического расщепления амидов должны иметь между собой много общего, и это общее и проявляется в сходстве активных центров амидгидролаз.

Современные представления о механизмах ферментативных реакций многим обязаны обширным исследованиям неферментативных процессов, катализируемых относительно простыми соединениями. Это особенно относится к гидролитическим превращениям производных карбоновых кислот, являющимся объектом детального изучения на протяжении нескольких последних десятилетий (см. обзоры: [8, 1401-1406]).

3.1. Термодинамика

Гидролиз амидов в водных растворах при значениях pH, близких к нейтральным, фактически является суммой трех процессов:



Таким образом, наблюдаемая в эксперименте константа равновесия реакции гидролиза (K_C) равна

$$K_C = \frac{[\text{R-COO}^-] \cdot [\text{H}_3\text{N-R}^1]}{[\text{RCONHR}^1] \cdot [\text{H}_2\text{O}]} = K_H \cdot K_A \cdot K_B, \quad (2)$$

где K_H - константа равновесия собственно гидролитической реакции; K_A - константа диссоциации образующейся кислоты; K_B - константа ассоциации (протонирования) амина. В выражении для K_C активность воды принимается за единицу. Заменяя K_B обычно используемой константой диссоциации сопряженного основания (K_{BH}), получим

$$K_C = K_H \cdot K_A / K_{BH} \quad (3)$$

или в терминах свободной энергии

$$\Delta G_C = \Delta G_H + \Delta G_A - \Delta G_{BH}. \quad (4)$$

Зная экспериментальное значение константы равновесия (и изменения свободной энергии) при данном pH и температуре, а также значения изменения свободной энергии при ионизации кислоты и основания, можно вычислить изменение свободной энергии собственно реакции гидролиза.

При биохимических исследованиях принято выражать изменение свободной энергии системы при pH 7,0. Поэтому значение ΔG должно быть определено или рассчитано для этого значения pH. То же относится и к изменениям свободной

энергии ионизации, которые рассчитываются для концентраций компонентов при pH 7. Эти величины связаны с K_A и K_{BH} следующими выражениями:

$$\Delta G_A = -RT \ln \left(1 + \frac{K_A}{10^{-7}} \right) + RT \ln (1 + K_A), \quad (5)$$

$$\Delta G_{BH} = -RT \ln \left(1 + \frac{10^{-7}}{K_{BH}} \right) + RT \ln \left(\frac{K_{BH} + 1}{K_{BH}} \right). \quad (6)$$

Как видно из приведенных в табл.22 данных, сама реакция гидролиза является эндотергической, т.е. происходит с поглощением энергии. Ионизация образующихся кислоты и основания проходит с выделением энергии. Вследствие этого суммарное изменение стандартной свободной энергии Гиббса для пептидов в интервале pH от 4 до 7 близко к нулю (рис.28).

Величина изменения свободной энергии (ΔG_H) мало зависит от строения пептидов. Наибольшие изменения этой величины наблюдаются для пептидов, содержащих рядом с гидролизуемой связью свободные amino- или карбоксильные группы. Это является следствием заметного изменения pK_a amino- и карбоксильных групп в свободных аминокислотах по сравнению с их N- или C-замещенными производными. Такие производные аминокислот, как анилиды или эфиры, также существенно отличаются от замещенных пептидов по величине ΔG_H .

Изменение свободной энергии гидролитической реакции (ΔG_H) в области pH, близкой к 7, является функцией основности уходящей группы. Было предложено несколько эмпирических зависимостей, связывающих эти величины, например [1410]:

$$\Delta G_H = 0,3 + 0,6 pK_{BH}. \quad (7)$$

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что в таких корреляционных зависимостях, являющихся формой более общего уравнения Бренстеда (см. разд. 3.4.2), коэффициент β при значении переменной pK_{BH} всегда близок 0,6. Это значение сохраняется для большинства реакций ацильного переноса на соединения, содержащие атомы O или N (но не S) [1409]. Реакция гидролиза включает не только процессы 1-3, показанные на схеме (1). Само присоединение нуклеофила (воды) является сложным процессом.

Амиды - резонансно-стабилизированные структуры, и присоединение нуклеофила к карбонильной группе приводит к потере энергии резонансной стабилизации. Таким образом, присоединение нуклеофила можно рассматривать как совокупность по крайней мере двух процессов: электронной перестройки, приводящей к локализации связей и потере резонансной стабилизации, и собственно присоединение нуклеофила. Была предпринята попытка [1417] оценить свободные энергии этих двух процессов отдельно, используя данные по барьерам враще-

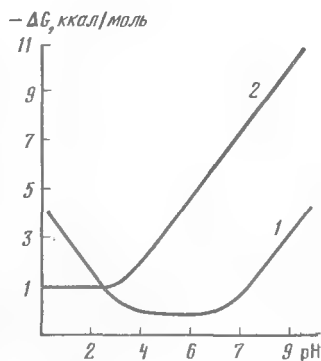


Рис.28. Зависимость от pH суммарной свободной энергии гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-фенилаланил-L-тирозина (1) (амидная связь) и метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (2) (эфирная связь) [1413]

Таблица 22. Значения ΔG_C и ΔG_H для некоторых пептидов, амидов и эфиров

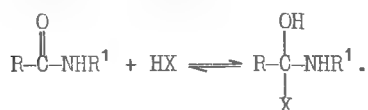
Соединение	ΔG_C , ккал/моль (pH 7; 25°C)	pK _a	pK _{BH}	ΔG_H , ккал/моль	Литературный источник
HCO-NH ₂	-3,54	3,75	9,26	4,1	[1407]
CH ₃ CH ₂ CO-NH ₂	-2,1	4,87	9,26	4,0	[1408]
CH ₃ CO-NHC ₆ H ₅	-3,7	4,75	4,58	-0,36	[1409]
AcPhe(NO ₂)-NH ₂	-2,05	3,2	9,26	6,2	[1410]
AcPhe-NHC ₆ H ₄ NO ₂	-3,94	3,3	1,02	1,1	[1411]
AcPhe-GlyNH ₂	-0,8	3,3	7,93	5,4	[1412]
AcPhe-AlaNH ₂	-0,91	3,3	8,2	5,8	[1412]
AcPhe-TyrOEt	-0,05	3,3	7,5	5,84	[1413]
Gly-Gly	-4,3	2,35	9,78	3,9	[1414]
AcPhe-OMe	-6,0	3,3	-	1,2	[1415]
CH ₃ CO-OCH ₂ CH ₃	-4,72	4,75	-	1,6	[1416]

ния вокруг связи C-N и данные по присоединению нуклеофилов к кетонам [1418] с соответствующими поправками на индуктивные и резонансные эффекты заместителей. Полученные значения показывают, что основной вклад в свободную энергию присоединения нуклеофила вносит изменение резонансной стабилизации (табл.23).

Таблица 23. Изменения свободной энергии присоединения нуклеофила (ΔG_1) и свободной энергии резонансной стабилизации амидов (ΔG_2) [1417]

Амид	Нуклеофил	K ₁ , M ⁻¹	ΔG_1 , ккал/моль	ΔG_2 , ккал/моль
HCONHCH ₃	CH ₃ OH	2,2·10 ³	-4,6	22,0
CH ₃ CONH(CH ₃) ₂	CH ₃ OH	1,2	0,11	18,7
"	CF ₃ CH ₂ OH	3,8·10 ⁻²	1,96	18,7
"	C ₆ H ₅ OH	1,7·10 ⁻²	2,44	18,7
"	C ₂ H ₅ SH	60	-2,45	18,7
HCON(CH ₃) ₂	CH ₃ OH	2,2·10 ³	-4,6	21,0
C ₆ H ₅ CON(CH ₃) ₂	CH ₃ OH	6,0·10 ⁻³	3,07	15,8
HCONHC ₆ H ₅	NH(CH ₃) ₂	4,9·10 ⁷	-10,6	17,7

Приведенные в табл.23 величины, конечно, нельзя сопоставлять со значениями ΔG_H из табл.22, поскольку в этом случае рассматривается лишь часть общего процесса, включающая только образование, но не распад промежуточного продукта присоединения нуклеофила к карбонильному атому углерода:



Этот промежуточный продукт обычно называют тетраэдрическим промежуточным

соединением, и о нем подробно будет говориться в разделе 3.3.2.

Калориметрические исследования гидролиза пептидной связи [1419-1422] показали, что реакция сопровождается относительно небольшим отрицательным тепловым эффектом. Этот эффект тем больше, чем выше pK_a образующихся продуктов гидролиза. Так, ΔG° для гидролиза BzTyr-GlyNH_2 по связи Tyr-Gly составляет $-1,55$ ккал/моль, а для гидролиза BzTyrNH_2 имеет значение $-5,84$ ккал/моль.

Поскольку ионизация образующегося амина сопровождается сильным отрицательным изменением энтальпии ($-12,4$ ккал/моль [1423]), реакция гидролиза соответственно характеризуется поглощением тепла, тем большим, чем меньше pK_a отщепляемого амина.

Оценка изменения энтропии для двух приведенных выше соединений дает значения соответственно -5 и $-12,5$ э.е. При ионизации аминогруппы изменение энтропии близко к нулю, тогда как ионизация карбоксильной группы дает $\Delta S^\circ \sim -22$ э.е. Таким образом, собственно процесс расщепления амидной связи характеризуется положительным изменением энтропии порядка $10-15$ э.е.

Положение равновесия в системе сильно смещается в сторону синтеза при изменении полярности среды (рис.29) [1408,1424].

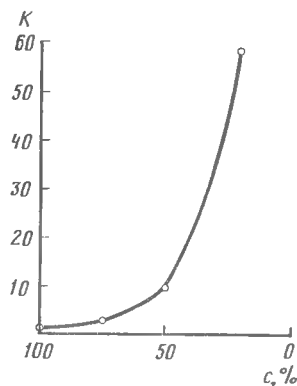
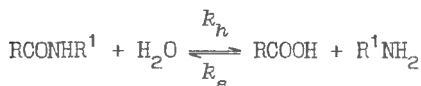


Рис.29. Изменение относительной константы равновесия синтеза-гидролиза пропионамида в зависимости от концентрации *n*-пропанола в воде. Построено по данным [1408]

3.2. Кинетика

Положение равновесия в системе



достигается очень медленно. Прямое определение скорости гидролиза пептидной связи при нейтральном pH и комнатной температуре [1425] дало значение константы скорости псевдопервого порядка $3 \cdot 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ ($\tau_{1/2}$ 7 лет), а та же константа для *N*-метилацетамида, полученная экстраполяцией данных щелочного гидролиза к нулевой концентрации ионов OH^- оказалась всего лишь $3,5 \cdot 10^{-13} \text{ с}^{-1}$ [1426].

В реальных условиях скорости гидролиза амидов существенно выше, поскольку при любых значениях pH в водном растворе присутствуют ионы OH^- и H_3O^+ , катализирующие реакцию гидролиза. Таким образом, наблюдаемая в эксперименте константа скорости гидролиза (k') является величиной эффективной и складывается по крайней мере из трех величин, характеризующих скорости катализируемого водой гидролиза ($k_{\text{H}_2\text{O}}$), гидролиза, катализируемого гидроксил-ионом (k_{OH}) и ионом гидроксония (k_{H^+}):

$$k' = k_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{H}}[\text{H}_3\text{O}^+]. \quad (8)$$

В определенных интервалах pH, где можно пренебречь концентрацией гидроксил-ионов или ионов гидроксония, уравнение (8) редуцируется до уравнений (9) и (10):

$$k' = k_{H_2O} + k_{OH}[OH^-], \quad (9)$$

$$k' = k_{H_2O} + k_H[H_3O^+]. \quad (10)$$

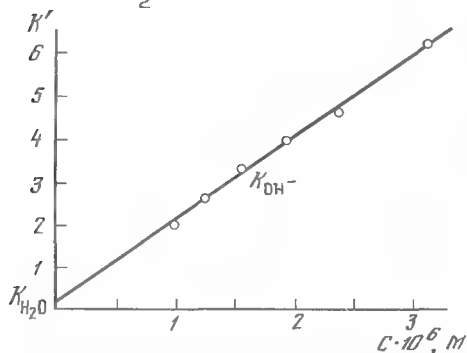


Рис.30. Типичный график зависимости наблюдаемой константы скорости щелочного гидролиза от концентрации гидроксил-ионов

или H_3O^+ -ионов. Однако первый порядок может соблюдаться не во всем интервале концентраций, и это является указанием на более сложный механизм гидролиза (см. разд.3.4.2).

Константы скорости щелочного и кислотного гидролиза амидов значительно выше, чем константы скорости некатализируемого процесса [1429]. Их значения для большинства амидов лежат в области $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ (табл.24).

Можно видеть, что щелочной гидролиз сложных эфиров происходит значительно быстрее, чем амидов. В то же время кислотный гидролиз сложноефирной связи идет на три-четыре порядка медленнее, чем щелочной. Для амидов различия в константах скорости щелочного и кислотного гидролиза невелики.

Таблица 24. Константы щелочного и кислотного гидролиза некоторых амидов и других производных карбоновых кислот (25°C)

Соединение	$k_{OH} \cdot 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger$ ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$ е.е.	$k_H \cdot 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger$ ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$ е.е.	Литературный источник
CH_3CONH_2	38	13,3	-32,8	2,1	22,0	-18,4	[1426]
$CH_3CONHCH_3$	3,29	16,6	-29,1	0,145	20,6	-21,6	[1426]
$CH_3CONHC_2H_5$	1,06	16,4	-32,7	0,143	17,6	-31,8	[1426]
$CH_3CON(CH_3)_2$	6,8	15,1	-31,4	0,134	20,5	-22,2	[1426]
$CH_3COOC_2H_5$	980	—	—	1,12	—	—	[1427]
$BzPhCOOC_2H_5^*$	500	—	—	0,033	—	—	[1428]
$CH_3COOC_6H_4NO_2^{**}$	$5,5 \cdot 10^4$	—	—	0,19	—	—	[1427]
$CH_3COSCH_3^{**}$	400	12,5	—	166	16,5	—	[1401]

*В 85% C_2H_5OH (k_{OH}) и 70% диоксане (k_H).

**В 62% ацетоне.

3.2.1. Влияние структуры

Скорость гидролиза производных карбоновых кислот зависит от строения заместителей при расщепляемой группе. Эта зависимость определяется полярным, стерическим и резонансным эффектами заместителей (см. обзоры: [1430-1433]). Полярный, или индуктивный, эффект включает все процессы, с помощью которых заместитель может изменить электростатические взаимодействия в реакционном центре по сравнению с некоторым заместителем, выбранным в качестве стандарта. Это может быть разделение зарядов, делокализация электронов и т.п. Если заместитель находится в сопряжении с реагирующей группой, то такого типа полярный эффект рассматривают отдельно как резонансный эффект.

Стерический эффект возникает при появлении отталкивающих взаимодействий при сближении двух валентно не связанных атомов. Различают первичный стерический эффект, обусловленный непосредственно отталкиванием взаимодействующих атомов или групп, и вторичный стерический эффект, обусловленный изменением за счет отталкивания полярного и резонансного эффектов. Существует большое число уравнений, связывающих один или несколько из этих эффектов с константами скорости или равновесий в химических реакциях. Наиболее известным из них является уравнение Гаммета:

$$\lg k = \lg k_0 + \rho\sigma, \quad (11)$$

где k – константа скорости превращения данного вещества; k_0 – константа скорости для вещества, выбранного в качестве стандарта; σ – константа заместителя, являющаяся мерой полярного эффекта заместителя и не зависящая от типа реакции; ρ – константа реакции, показывающая чувствительность данной реакции к изменению полярного эффекта.

Тафт предложил [1431] другое корреляционное уравнение, позволяющее разделить полярные (в том числе и резонансные) эффекты и стерические эффекты заместителей:

$$\sigma^* = [\lg(k/k_0)_B - \lg(k/k_0)_A] / 2,48, \quad (12)$$

где индексы А и В относятся соответственно к кислотному и щелочному гидролизу, а величина 2,48 введена для того, чтобы величины σ и σ^* имели сопоставимые значения.

В основу этой корреляции положено несколько допущений, а именно: 1) полярные, стерические и резонансные эффекты вносят аддитивный вклад в свободную энергию активации; 2) стерический и резонансный эффекты вносят одинаковый вклад в реакции щелочного и кислотного гидролиза; 3) полярные эффекты в реакциях щелочного гидролиза значительно выше, чем в реакциях кислотного гидролиза.

Таким образом, если эти допущения верны, то отношение скоростей кислотного гидролиза двух соединений, одно из которых выбрано в качестве стандарта, характеризует сумму стерических и резонансных эффектов, а при отсутствии сопряжения заместителей с реагирующими атомами – только стерические эффекты. Выражение (12) может быть поэтому записано как

$$\lg(k/k_0) = \sigma^* \rho^* + \delta E_S, \quad (13)$$

где E_S – стерическая постоянная; δ – постоянная, показывающая чувствительность данной реакции к стерическим эффектам; ρ^* – постоянная, характеризую-

чая чувствительность реакции к полярным эффектам. Следует отметить, что роль полярных эффектов в гидролизе производных алифатических карбоновых кислот неоднократно подвергалась сомнению и, по-видимому, во многих работах преувеличивалась [1433-1435].

Данные по кинетике гидролиза амидов и сложных эфиров неоднократно подвергались корреляционному анализу по уравнению (13) или его модифицированным вариантам (см., например: [1436-1438]). Для алкильных заместителей как при карбонильном углероде, так и при атоме азота амидной группы значение σ^* лежат в области 0-0,4 и, по-видимому, вносят очень небольшой эффект в наблюдаемую скорость гидролиза. Было высказано мнение, что величина σ^* может быть составляющей стерической постоянной (E_S), т.е. для алкильных групп существует связь между σ^* и E_S , выражаемая уравнением [1439]:

$$E_S = 0,88 + 27,78\sigma^* - 1,9(n-3),$$

где n - число атомов водорода при α -углеродном атоме.

Стерический эффект может включать и резонансную составляющую. Было предложено [1440] использовать исправленную стерическую постоянную $E_S^C = E_S - h(n-3)$, где h - реакционная константа, учитывающая сверхсопряжение, и n - число атомов α -H. Наконец, было предложено учитывать число протонов при шестом атоме углерода [1441] или число протонов в положении 7 ($H-7$) [1437], влияющих на стерический эффект заместителя.

В табл.25 приведены некоторые корреляционные уравнения для гидролитических реакций.

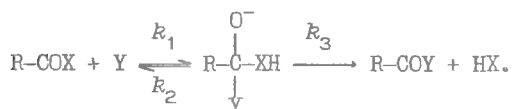
Таблица 25. Корреляционные уравнения для гидролиза некоторых производных уксусной кислоты [1437]

Реагент	Растворитель	Температура, °C	Корреляционное уравнение
$\text{CH}_3\text{CONHR} + \text{OH}^-$	1 н. NaOH	75	$\lg k = -1,67 + 0,9E_S^C + 0,056(H-7)$ $R=0,984; s=0,056$
$\text{CH}_3\text{COOR} + \text{OH}^-$	40%-ный диоксан	35	$\lg k = 1,31 + 1,1\sigma^* + 0,78E^C + 0,068(H-7)$ $R=0,998; s=0,044$
$\text{CH}_3\text{COOR} + \text{H}_3\text{O}^+$	14%-ная H_2SO_4	25	$\lg k = -1,78 - 0,042(H-7)$ $R=0,866; s=0,046$
$\text{CH}_3\text{COSR} + \text{OH}^-$	40%-ный диоксан	35	$\lg k = 1,14 + 0,66\sigma^* + 0,23E_S^C$ $R=0,955; s=0,061$

Константа скорости реакции часто поддается корреляции с основностью уходящей группы или кислотностью образующей амид кислоты, т.е. соблюдаются зависимости типа уравнения Бренстеда [1442,1443]:

$$\lg k = \lg k_0 + \alpha \cdot \text{p}K_a.$$

Более информативен анализ влияния структуры на константы скорости отдельных стадий гидролитической реакции (см., например: [1444,1445]). Как будет подробнее показано ниже, перенос ацильной группы у производных карбоновых кислот описывается как минимум двухстадийной схемой:



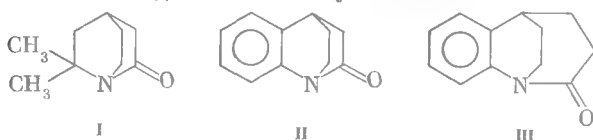
Изменения в структуре субстратов могут влиять на наблюдаемую константу (k'), на величину k_1 и на отношение k_2/k_3 [8] (табл.26).

Таблица 26. Влияние структурных изменений на скорость реакции $\text{RCOX} + \text{Y}$

Увеличение электронно-акцепторных свойств заместителя в группе	k_1	$\alpha=k_2/k_3$	k'
R	Увеличение	Увеличение	Увеличение
X	"	Уменьшение	"
Y	Уменьшение	Увеличение	Уменьшение

До сих пор мы рассматривали поведение "нормальных" амидов в реакциях гидролиза и ацильного переноса. Уже упоминалось, что среди субстратов амид-гидролаз существуют "аномальные" амиды, а именно β -лактамы, входящие в состав бициклической системы пенициллиновых антибиотиков. Особенность β -лактамной группировки заключается в том, что в ней сильно снижено или отсутствует резонансное взаимодействие неподеленной пары электронов атома азота с π -электронами карбонильной двойной связи. Это заметно сказывается на устойчивости β -лактамного цикла в гидролитических реакциях [1446-1448].

То же самое наблюдается и для других типов резонансно дестабилизированных амидов - 2,2-диметилхиноклидона (I) [1449], 3,4-дигидро-2-оксо-1,4-этанохинолина (II) и 2,3,4,5,-тетрагидро-2-оксо-1,5-этанобензазепина (III) [1450-1452]. По сравнению с нормальными амидами, скорость щелочного гидролиза таких соединений может увеличиваться на 6-8 порядков [1450].



Таким образом, резонансная стабилизация гидролизующей группы в производных карбоновых кислот вносит существенный вклад в устойчивость этих соединений к гидролизу. Выше уже отмечалось, что резонансная стабилизация является определяющим фактором при изменении свободной энергии присоединения нуклеофилов к амидам (см. табл.23). Отсюда следует, что соединения, в которых имеется α,β -ненасыщенная связь, "сопряженная" с амидной группой, должны гидролизироваться существенно медленнее, чем несопряженные амиды. Однако резонансный эффект в гидролизе (алкоголизе) амидов оказался весьма небольшим. Так, энергия активации алкоголиза увеличивается на 0,6 ккал/моль при введении α,β -двойной связи [1453]. Аналогичный эффект при присоединении нуклеофилов к кетонам составляет +3,1 ккал/моль [1454]. Исследование гидролиза ацилимидазолов [1455] показывает, что в этих соединениях резонансный эффект также меньше ожидаемого.

Существуют многочисленные корреляции констант заместителей с различными физико-химическими свойствами производных карбоновых кислот [1432,1437], в

том числе и конформаций амидов. Было показано [1456], что величина σ^* хорошо коррелирует с общим зарядом на алкильной группе, вычисленным квантовохимическими методами.

Корреляционный анализ широко применяется при изучении механизмов гидролиза, и мы будем использовать соответствующие данные при рассмотрении этой проблемы.

3.2.2. Влияние среды

Среда, в которой проводится реакция, может очень сильно влиять не только на скорость [1457], но и на сам механизм реакции [1458, 1459]. Как правило, скорость гидролиза амидов уменьшается с уменьшением диэлектрической проницаемости среды. Это обусловлено тем, что реакция гидролиза является ион-дипольным или диполь-дипольным взаимодействием, а свободная энергия электростатического взаимодействия при образовании активированного комплекса реагирующих атомов обратно пропорциональна диэлектрической проницаемости:

$$\Delta G^\ddagger = \frac{Z_A Z_B e^2}{Dr^\ddagger},$$

где Z_A и Z_B - заряды ионов; e - заряд электрона; D - диэлектрическая проницаемость; $r^\ddagger$ - расстояние между атомами в комплексе. Отсюда зависимость константы скорости от D можно представить в виде [1460]

$$\lg k = \lg k_0 - C \frac{1}{D},$$

где k_0 - константа скорости при $D \rightarrow \infty$ и $C = NZ_A Z_B e^2 / RT r^\ddagger$ (N - число Авогадро; R - универсальная газовая постоянная; T - абсолютная температура).

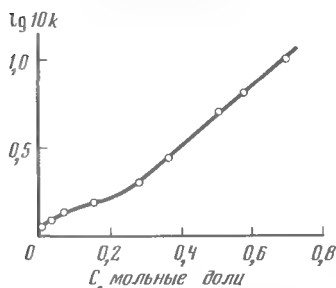


Рис. 31. Зависимость константы скорости гидролиза сложного эфира от концентрации диметилсульфоксида в воде [1462]

Это уравнение соблюдается далеко не во всех случаях. Положение осложняется различиями в структуре переходного состояния, специфическими эффектами сольватации и т.п. Так, скорость гидролиза эфиров в смеси ацетон-вода линейно зависит от концентрации ацетона (вплоть до 60%), но в смесях диметилсульфоксид-вода при больших концентрациях органического растворителя резко увеличивается (рис. 31) [1462].

Было предложено несколько корреляционных уравнений, связывающих скорость реакции и свойства растворителя [1461].

Ионная сила раствора также может влиять на скорость гидролиза производных карбоновых кислот. Эти эффекты проявляются в основном при высокой ионной силе за счет изменения коэффициентов активности реагирующих молекул, изменения сольватации в переходном состоянии и др. Прямые эффекты ионной силы, проявляющиеся при ее низких значениях, наблюдаются обычно в реакциях между ионами, что можно описать уравнением Дебая-Хюккеля:

$$\ln k = \ln k_0 + 2Z_A Z_B \alpha \sqrt{\mu},$$

где μ – ионная сила и α – константа, зависящая от растворителя и температуры.

Наконец, следует остановиться на изменениях скоростей реакции гидролиза при замене воды на окись дейтерия [1463, 1464]. Влияние D_2O обусловлено изменением скорости переноса дейтерия по сравнению с протоном, а также различной сольватирующей способностью H_2O и D_2O и, наконец, так называемыми вторичными изотопными эффектами, связанными с заменой протонов в субстрате на атомы дейтерия. Сильное влияние D_2O ($k_H/k_D \approx 2+3$) проявляется в тех случаях, когда перенос протона происходит на лимитирующей скорости всего процесса стадии.

Анализ изотопных эффектов широко применяется при исследовании механизма гидролитических реакций.

3.3. Механизм

Описание механизма химической реакции подразумевает знание координат всех атомов реагирующей системы в каждый момент времени и энергии системы при каждом положении реагирующих атомов. Таким образом, состояние каждого атома характеризуется по крайней мере пятью переменными, а для нескольких реагирующих атомов полное описание процесса требует построения многомерной потенциальной поверхности, которую проходят реагирующие атомы на пути от начального состояния к продуктам реакции. Если на этом пути зафиксировать некоторые промежуточные состояния, различающиеся по энергии, то получим картину типа изображенной на рис. 32, а. Можно также спроецировать "путь реакции" на плоскость и получить так называемую карту альтернативных путей [1465], где в качестве независимых переменных используются порядки образующейся и разрывающейся связи (рис. 32, б).

При любом изображении можно выделить несколько особых точек на представленных графиках: 1 – исходное состояние; 2 – переходное состояние; 3 – промежуточный продукт; 4 – конечное состояние. Точке 2 в современных теориях

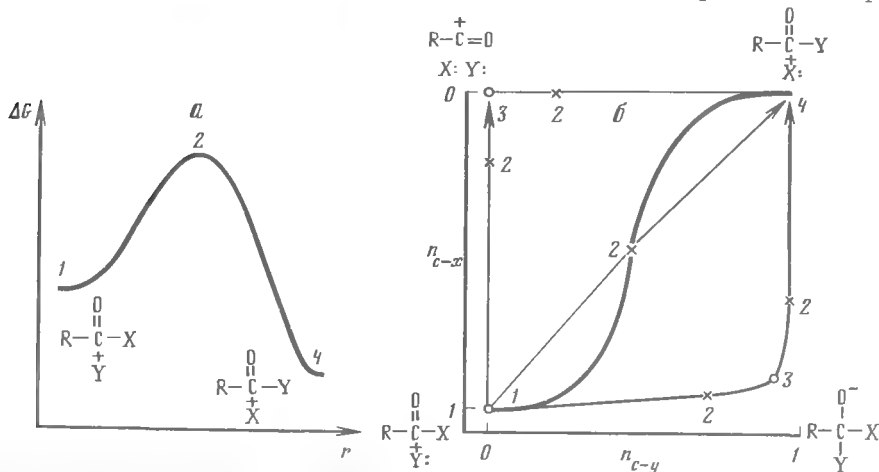
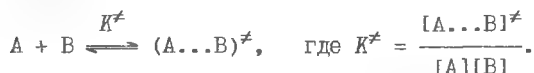


Рис. 32. Способы изображения пути реакции а – изменение потенциальной энергии по координате реакции r ; б – изменение порядков разрывающейся и образующейся связи n (карта альтернативных путей) [1465]; 1 – исходные реагенты; 2 – переходные состояния; 3 – промежуточные продукты; 4 – продукты реакции (воспроизведено по [1405])

химических реакций отводится особая роль. В соответствии с теорией абсолютных скоростей реакций реагирующие молекулы в переходном состоянии находятся в динамическом равновесии с исходным (и конечным) состоянием:



Соответствующее величине $K^\ddagger$ изменение стандартной свободной энергии Гиббса называется свободной энергией активации $\Delta G^\ddagger$. Частота распада активированного комплекса $(A...B)^\ddagger$ равна частоте колебаний разрываемой связи, т.е. $\nu = kT/h$, где k – константа Больцмана; h – постоянная Планка; T – абсолютная температура. При 25°C значение $\nu = 6,2 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Так как

$$[A...B]^\ddagger = [A][B]e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}, \quad \text{то}$$

$$\nu = \nu[A...B]^\ddagger = [A][B] \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}},$$

т.е. скорость реакции будет тем выше, чем ниже свободная энергия активации и чем выше "концентрация" активированного комплекса по отношению к концентрации молекул в исходном состоянии (см. рис. 32,а).

Существует корреляция между положением переходного состояния по координате реакции ($\chi^\ddagger$ – порядок образующейся связи), высотой энергетического барьера ($\Delta G^\ddagger$) и разницей в энергии исходных веществ и конечных продуктов (ΔG^0), например [1466,1467]:

$$\chi^\ddagger = \frac{1}{2 - \Delta G^0 / \Delta G^\ddagger}.$$

Переход от начального к конечному состоянию может происходить несколькими путями через разные переходные состояния. На рис. 32,б для реакции



даны четыре пути [1468]: два динамически сопряженных, т.е. характеризующихся одновременным изменением порядков связей C–X и C–Y и являющихся кинетически сопряженными (проходящими через одно и то же переходное состояние), но имеющих в этих состояниях различные колебательные координаты, и два динамически не сопряженных, проходящих через углы карты и включающих или образование промежуточного ацилиевого катиона (механизм S_N1), или образование промежуточного тетраэдрического соединения.

Ниже будет показано, что гидролиз амидов и большинства других производных карбоновых кислот идет через образование тетраэдрического промежуточного соединения.

3.3.1. Нуклеофильная атака

В зависимости от pH раствора нуклеофилом в реакциях гидролиза может выступать ион OH^- или молекула воды. Эти две частицы резко отличаются по свойствам, в частности по средству к протону, т.е. по нуклеофильности. Значения pK_a гидроксил-иона и молекулы воды составляют соответственно 15,74 и -1,74. Очевидно, что механизмы щелочного и кислотного гидролиза амидов должны быть разными.

В соответствии с распределением электронной плотности в амидной группе атака нуклеофила должна быть направлена на карбонильный атом углерода, несущий наибольший положительный заряд. Направление атаки должно быть таким, чтобы достигалось наибольшее перекрывание связывающих орбиталей реагирующих атомов. Первоначально считалось, что таким направлением является направление, перпендикулярное плоскости амидной группы. Последующие исследования [1469–1474] показали, однако, что это не совсем так. Рентгеноструктурное изучение серии аминокетонов [1469, 1470], а также квантово-химические расчеты [1471–1475] позволили следующим образом описать взаимодействие нуклеофила с карбонильной группой. При приближении отрицательно заряженной частицы к карбонильному атому углерода происходит изменение плоской конфигурации амидной группы и атом углерода выходит из плоскости, образованной карбонильным кислородом, атомом азота и атомом α -С. Наблюдается "пирамидализация" амидной группы (рис. 33), которая тем больше, чем меньше расстояние между нуклеофилом и карбонильным С-атомом. Для кетонов взаимосвязь степени пирамидализации (Δ) и расстояния между атомом углерода и нуклеофилом (d_1) выражается эмпирической формулой

$$d_1 = -0,851g(\Delta/\Delta_t)^2 + 1,48 \text{ \AA},$$

где Δ_t – величина пирамидализации в тетраэдрической структуре ($\Delta_t = 0,44 \text{ \AA}$). Угол атаки нуклеофила остается постоянным на всем пути его приближения к карбонильному углероду и составляет 107° , т.е. очень близок к тетраэдрическому.

Аналогичные выводы были получены [1476] на основе концепции "стереоэлектронного контроля", в соответствии с которой наиболее прочной связью в тетраэдрическом соединении является та, которая имеет наименьшее число свободных орбиталей, расположенных в антиперипланарной конформации к свободным орбиталиям других атомов. Эта концепция оказалась плодотворной при анализе распада тетраэдрических промежуточных соединений и будет подробнее рассмотрена ниже.

Пирамидализация амидной группы в ходе нуклеофильной атаки приводит, оче-

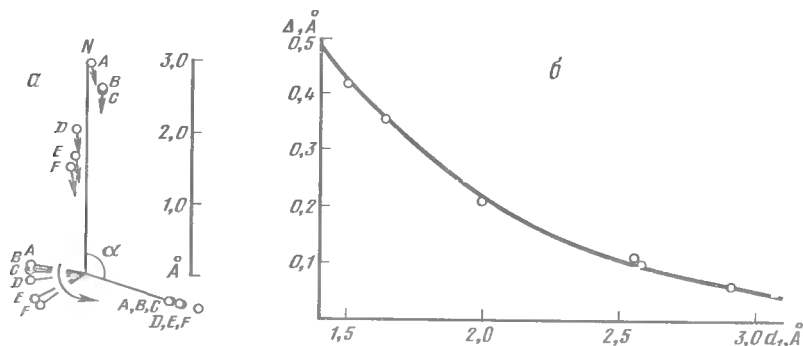


Рис. 33. Атака нуклеофильного атома азота (N) в циклических аминокетонах на карбонильный атом углерода [1469]
 а – расстояния между N и C' и углы α –C'–O в аминокетонах с различной величиной цикла (А–F); б – зависимость пирамидализации карбонильной группы (Δ) от расстояния между нуклеофилом и карбонильным С-атомом

видно, к нарушению резонансного взаимодействия свободной пары электронов атома азота с π -электронами карбонильной группы, что, в свою очередь, способствует присоединению нуклеофила. Таким образом, в ходе образования связи происходит как бы взаимная подстройка реагирующих групп, способствующая более полному перекрыванию связывающих орбиталей.

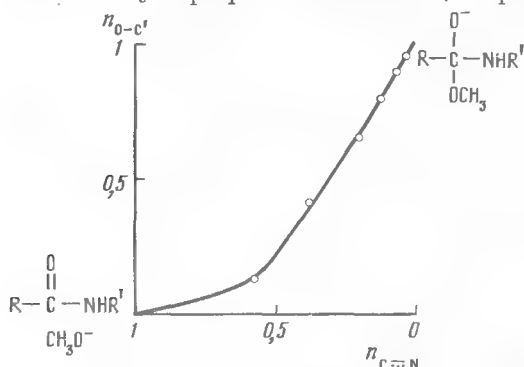


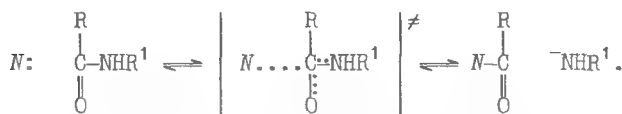
Рис.34. Изменение двоесвязанности связи C-N в зависимости от порядка образующейся связи O-C' при взаимодействии метоксианиона с N-метилацетамидом (по данным [1477])

да связь $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}$ еще практически не образовалась.

При кислотном гидролизе события, по-видимому, должны подчиняться тому же порядку, с той разницей, что низкая нуклеофильность воды вряд ли может индуцировать заметную пирамидализацию амидной группы. При высоких концентрациях ионов H^+ присоединение воды будет облегчаться протонированием атома кислорода карбонильной группы (для амидов $\text{pK}_a \text{ O} \approx +1$), что приводит к снижению резонансной стабилизации амида и повышению электрофильности карбонильного углерода. Низкие скорости кислотного гидролиза сложных эфиров (см. табл. 24) возможно обусловлены существенно более низким значением pK_a (-6 – -7) у этих соединений по сравнению с амидами.

3.3.2. Тетраэдрическое промежуточное соединение

Присоединение нуклеофила к амидной группе, как уже указывалось, приводит к понижению порядка связи C-N и увеличению отрицательного заряда на атоме азота. Можно представить себе, что дальнейшее развитие процесса будет проходить в том же направлении и в конечном счете связь C-N будет разрываться, т.е. реакция пойдет по $\text{S}_\text{N}2$ -механизму:

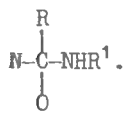


Однако уход аминогруппы в виде аниона невозможен, поскольку такой анион является чрезвычайно сильным основанием ($\text{pK}_a \approx 18$; см. разд.1.2.3). Необходимо, чтобы уходящая группа сначала присоединила протон. Уход аминосоставляющей амидов в виде аниона, по-видимому, происходит лишь в случае очень слабоосновных анилидов. Так, pK_a *n*-нитроанилид-аниона ≈ 14 [1478], и эта группа в

Квантово-химический анализ присоединения метоксил-иона к N-метилацетамиду позволяет представить ход реакции на карте альтернативных путей, как это показано на рис.34 [1477].

Как видно, присоединение нуклеофила приводит к снижению порядка связи C-N, и заряд на атоме азота увеличивается. Характерно, что значительная доля двоесвязанности атомов C и N теряется на ранних этапах присоединения нуклеофила, ког-

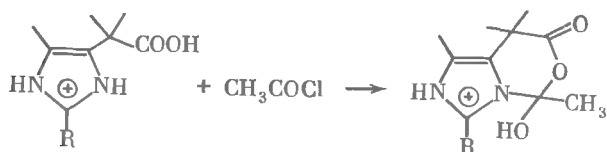
принципе может отщепляться до стадии протонирования. При гидролизе обычных амидов стадии отщепления уходящей группы предшествует ее протонирование, т.е. существует промежуточное соединение типа (IV):



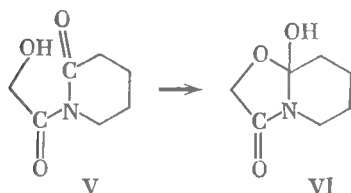
IV

Образование таких тетраэдрических промежуточных соединений в ходе гидролиза производных карбоновых кислот было доказано в некоторых особых случаях прямым их выделением физико-химическими методами (см. в обзоре: [1479]), а также исследованиями обмена кислорода в исходном субстрате на изотоп ^{18}O из тяжелоокислородной воды [1480].

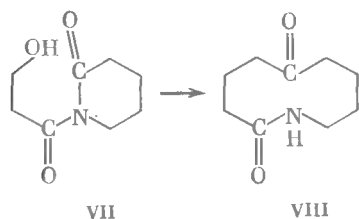
Относительно стабильные тетраэдрические промежуточные соединения образуются при присоединении алколят-ионов к трифторацетамиду или эфиру трифторуксусной кислоты [1481]. При взаимодействии хлористого ацетила с производными имидазола также удалось выделить стабильный тетраэдрический промежуточный продукт [1482]:



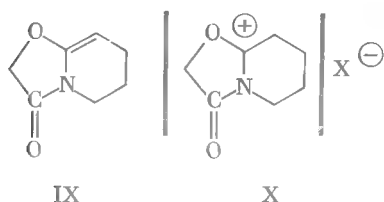
Внутримолекулярная перегруппировка N-(α -оксиацил)-лактамов (V) приводит к стабильным соединениям этого типа - так называемым циклолам (VI) [1483, 1484]:



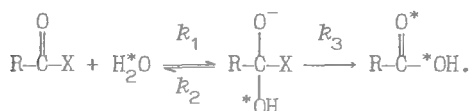
Исследование свойств таких соединений [1484] показало, что третичный гидроксил имеет pK_a 10-11. Легко происходит расщепление связи C-O (цикл) и C-N. Так, циклолы типа (VI) существуют в равновесии с ациллактами (V), однако, если суммарное число атомов в циклической системе равно или больше десяти, то соответствующие циклолы выделить не удастся, а образуются макроциклы (VII) $\rightarrow$ (VIII):



Циклолы типа (VI) довольно легко дегидратируются в (IX), а в сильноокислой среде образуют соли соответствующих карбокатионов (X):



Исследование обмена кислорода в амидах и других производных карбоновых кислот дает количественную характеристику устойчивости промежуточных тетраэдрических соединений. Такой обмен наблюдается в случаях, когда скорость распада тетраэдрического промежуточного соединения в направлении продуктов гидролиза сравнима со скоростью его распада в направлении исходного вещества [1480, 1485, 1486]:



При этом наблюдаемая скорость гидролиза

$$k_h = \frac{k_1}{1 + k_2/k_3},$$

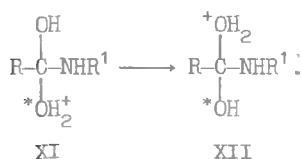
а скорость обмена кислорода в субстрате

$$k_e = \frac{k_1}{2(1 + k_3/k_2)}.$$

Исследуя скорость включения ^{18}O из H_2^{18}O в субстрат (или скорость потери ^{18}O метки в меченом субстрате), можно получить величины $k_1 = 2k_e + k_h$ и отношение $k_2/k_3 = \alpha = 2k_e/k_h$.

Оказалось, что у первичных амидов $k_2/k_3 > 1$, т.е. тетраэдрическое промежуточное соединение быстрее превращается в исходное, тогда как в случае сложных эфиров наблюдается противоположная картина (табл. 27). В случае третичных амидов величина $k_2/k_3 < 1$.

При кислотном гидролизе амидов продукт присоединения воды имеет строение (XI):



Для того, чтобы произошел обмен кислорода, необходимо депротонировать присоединившуюся молекулу воды и присоединить протон к гидроксильной группе (XI) → (XII). Однако гидроксил — более слабое основание, чем группа NHR, и протонирование должно быть в основном направлено на эту группу. Таким обра-

Таблица 27. Гидролиз и ^{18}O -обмен амидов и сложных эфиров

Соединение	$t, ^\circ\text{C}$	$k_h \cdot 10^5, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_e \cdot 10^5, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$\alpha = k_2/k_3$	Литературный источник
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}_2$	40,7	4	76	$1,92 \cdot 10^{-4}$	4,22	[1485]
$\text{HCON}(\text{Me})\text{CH}_2\text{Ph}$	27	12	3,97	$1,99 \cdot 10^{-4}$	0,66	[1487]
$\text{CD}_3\text{CON}(\text{Me})\text{CH}_2\text{Ph}$	40	0,893	0,0862	$1,06 \cdot 10^{-5}$	0,19	[1487]
$\text{CH}_3\text{CD}_2\text{CON}(\text{Me})\text{CH}_2\text{Ph}$	70	2,91	0,767	$4,44 \cdot 10^{-5}$	0,52	[1487]
$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOC}_2\text{H}_5$	25	840	7,4	$9,70 \cdot 10^{-3}$	0,18	[1485]

зом, при кислотном гидролизе амидов отношение k_2/k_3 , по-видимому, очень мало и обмен кислорода в субстрате не наблюдается [1480]. Однако при высоких концентрациях H_3O^+ такой обмен удается обнаружить [1488].

3.3.3. Перенос протона и образование продуктов

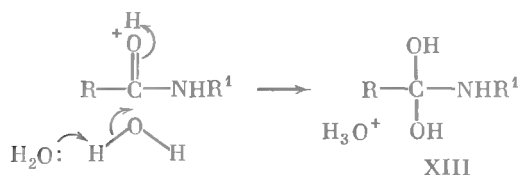
Образование промежуточного тетраэдрического соединения и его распад до продуктов реакции сопровождается переносом протонов. Этот процесс является экзотергическим в том случае, когда он происходит от более слабого основания к более сильному, т.е. когда $\text{p}K_{\text{a}}$ донора ниже, чем $\text{p}K_{\text{a}}$ акцептора [1489]. В такой ситуации скорость переноса протона контролируется диффузией. Прямое измерение скорости диффузионного переноса протона методом лазериндуцируемого протонного сдвига [1490] дает значения константы скорости порядка $2 \cdot 16 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$. В случае коллизионного переноса протона (прямое столкновение двух молекул) эта величина составляет $10^8\text{--}10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

При обратном соотношении основностей: $\text{p}K_{\text{a}}$ (донор) $\text{p}K_{\text{a}}$ (акцептор), скорость переноса протона можно оценить по уравнению

$$\lg k = \lg k_0 - [\text{p}K_{\text{a}}(\text{донор}) - \text{p}K_{\text{a}}(\text{акцептор})], \quad (14)$$

где k_0 - константа скорости диффузионного переноса протона, принимаемая обычно равной $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

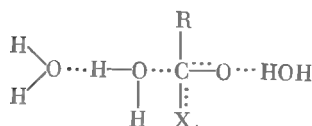
Именно такое положение существует при кислотном гидролизе амидов. Как уже отмечалось, вода - слишком слабый нуклеофил, чтобы в заметной концентрации могло образоваться соединение типа (XI). В то же время отрыв протона от атакующей молекулы воды - термодинамически невыгодный процесс, его скорость должна характеризоваться константой порядка $10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, т.е. отрыв протона на предстационарной стадии может не обеспечивать наблюдаемые скорости гидролиза. В этом случае должен происходить согласованный процесс атаки и отрыва протона:



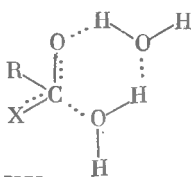
При согласованном механизме образование связи C-O приводит к увеличению положительного заряда на атоме кислорода воды, т.е. уменьшает $\text{p}K_{\text{a}}$ сопряжен-

ной кислоты. При константе скорости гидролиза порядка $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ перенос протона от воды перестанет лимитировать скорость всего процесса, если pK_a атакующей молекулы понизится с 15,74 до 12–13.

Переносу протона должно предшествовать образование водородной связи. Геометрия системы водородных связей во многом определяет легкость перемещения протона от одного атома к другому [1491–1493]. Эта геометрия определяет также структуру переходного состояния. В кислотно-катализируемых реакциях гидролиза производных карбоновых кислот переходное состояние было исследовано теоретически и экспериментально [1494–1498], причем были предложены как линейные (XIV), так и циклические (XV) структуры:

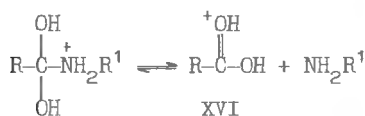


XIV



XV

Распаду тетраэдрического промежуточного соединения типа (XIII) должно предшествовать протонирование уходящей аминогруппы и депротонирование гидроксильной группы. Последний процесс связан с тем, что равновесие в реакции



сдвинуто влево из-за низких значений pK_a сопряженной кислоты (XVI). В ряде случаев [1499] превращение нейтрального тетраэдрического соединения (XIII) в цвитерионное может быть лимитирующей стадией всего процесса.

При образовании тетраэдрического промежуточного соединения сильно увеличивается pK_a аминогруппы, которое в конечном счете приобретает значение порядка 5–7 [1499, 1500]. Таким образом, протонирование этой группы должно проходить с диффузионно-контролируемыми скоростями практически во всем используемом для гидролиза интервале pH. Более того, возможно [1501], что в некоторых случаях протонирование и уход аминогруппы происходят еще до завершения образования тетраэдрического промежуточного соединения, т.е. реакция идет в значительной степени по S_N2 -механизму.

Сложнее ситуация при гидролизе эфиров. В этом случае pK_a группы C-OR весьма низкое (около -6) и ее протонирование может стать стадией, лимитирующей скорость. В том случае, когда группа R сильный акцептор электронов, pK_a соответствующего алколят-иона R-O^- становится низким [1502], и эта группа может уходить в виде аниона. В случае алкильных заместителей отщепление группы OR и ее протонирование происходят, по-видимому, по согласованному механизму.

Участие переноса протона в стадии, лимитирующей скорость всего процесса, можно установить, исследуя реакцию в тяжелой воде и измеряя отношение $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ [1503]. Обычно для таких реакций это отношение близко к трем. Был

предложен метод [1504], позволяющий оценить число протонов, переносимых на лимитирующей стадии. Он заключается в измерении скорости реакции в смесях $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ с различным содержанием тяжелой воды. При этом константа скорости связана с мольной долей D_2O (n) и долей изотопного замещения в переходном состоянии ϕ_i^T соотношением (15):

$$k_n = k_o \prod_1^i (1 - n + n\phi_i^T), \quad (15)$$

где k_o – константа скорости реакции в H_2O ; i – число переносимых протонов. Для $i=1$ график в координатах k_n/n линеен, а при других значениях проявляет-ся отклонение от линейности (см., например: [1505, 1506]).

Следует отметить, что теоретические предпосылки кинетических изотопных эффектов растворителя основаны на изменении энтальпии процесса при изотопном замещении. Однако было показано [1507], что отношение $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ может определяться изменением трансляционной энтропии в основном за счет сольватации в переходном состоянии, т.е. это отношение не обязательно характеризует скорость переноса протона. Кроме того, перенос протона является довольно сложным процессом, включающим стадии диффузии, реорганизации растворителя, ориентации и т.п., поэтому собственно перемещение протона лишь в редких случаях может быть наиболее медленной стадией всего процесса [1508, 1509]. Исследование кинетических изотопных эффектов многостадийных реакций описано в работе [1510], а связь кинетических изотопных эффектов со свободной энергией реакции – в работе [1511].

Наконец, перенос протона может происходить путем туннельного эффекта. Соответствующая квантово-механическая теория кинетики переноса протона была развита Догонадзе с соавт. [1512].

Изучение распада тетраэдрических промежуточных соединений проводится с использованием модельных веществ типа ацеталей (см., например: [1513, 1514]) путем анализа влияния основности нуклеофила и уходящих групп на скорость реакции, а также по данным о влиянии изотопного замещения на скорость процесса [1515–1517]. Величина изотопного эффекта, вносимого заменой ^{16}O на ^{18}O или ^{14}N на ^{15}N , может быть рассчитана на основании нулевых уровней энергии связи по ИК-спектрам соответствующих соединений. Общий вывод из этих исследований заключается в том, что при щелочном гидролизе эфиров лимитирующей стадией, как правило, является образование тетраэдрического промежуточного соединения, а при гидролизе амидов – его распад.

Экспериментальные и теоретические исследования [1470–1472, 1518–1521] показывают, что распад тетраэдрических промежуточных соединений зависит от их конформации, т.е. подвержен стереозлектронному контролю (см., однако: [1522]). Преимущественно разрывается та связь, у которой перекрывание орбиталей свободных электронных пар с орбиталями других атомов минимально. Минимальное перекрывание орбиталей достигается тогда, когда они расположены относительно друг друга антиперипланарно.

Как видно из рис.35, в конформации (а) диоксиаминометана все три связи равноценны по числу антиперипланарных орбиталей; в конформации (б) свободная пара N-атома имеет две антиперипланарные к ней орбитали O-атомов, а в конформации (в) аналогичная ситуация реализуется для свободных пар атома O_2 . Поэтому отщепление группы NH_2 будет происходить преимущественно в кон-

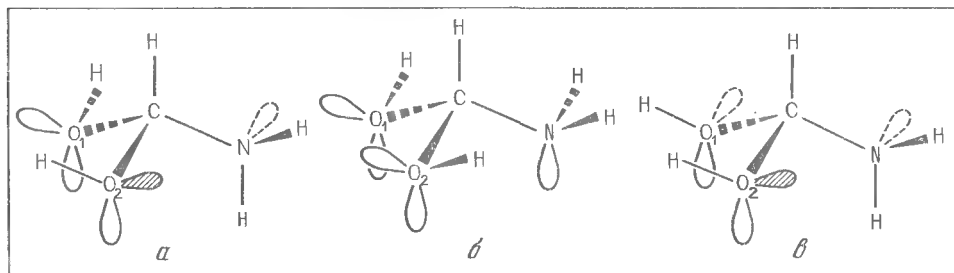


Рис.35. Три конформации (а, б, в) тетраэдрических промежуточных соединений

Связь	C-N (а)	C-O ₁ (а) ¹	C-O ₂ (а) ²	C-N (б)	C-O (б)	C-N (в)	C-O ₁ (в) ¹	C-O ₂ (в) ²
Антиперипланарные свободные пары	O ₁	O ₂	N	O ₁ , O ₂	-	-	O ₂	O ₁ , N
Длина связи, Å	1,440	1,414	1,417	1,485	1,406	1,430	1,427	1,447

формации (б), а отщепление группы OH - в конформации (в).

Как показали исследования гидролиза и кислородного обмена в третичных амидах типа $RCONH(Me)CH_2Ph$, конформационные переходы в соответствующих тетраэдрических промежуточных соединениях могут иметь активационный барьер порядка 5,5-8 ккал/моль [1487].

3.4. Катализ

Реакции гидролиза амидов и других производных карбоновых кислот ускоряются в присутствии различного типа катализаторов. Ниже будут рассмотрены основные закономерности гомогенного катализа гидролитических реакций.

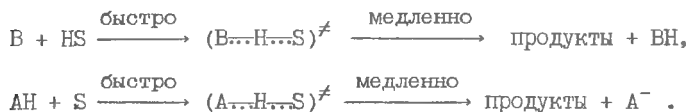
3.4.1. Классификация

По типу каталитического действия гомогенный катализ может быть разделен на кислотно-основной и нуклеофильно-электрофильный. При кислотно-основном катализе катализатор - кислота или основание - способствует присоединению или отщеплению протона. В случае нуклеофильного или электрофильного катализа катализатор образует с субстратом ковалентное промежуточное соединение.

Кислотно-основной катализ в свою очередь подразделяют на специфический и общий. При специфическом катализе катализатор полностью акцептирует (основание) или отдает (кислота) протон на стадии, определяющей скорость процесса. Таким образом, катализатор не входит в переходное состояние превращаемого субстрата или если и входит, то превращение субстрата не является лимитирующей стадией:



При общем катализе катализатор всегда входит в переходное состояние субстрата и распад его является стадией, лимитирующей скорость всего процесса:



В соответствии с этим катализ гидроксоний-ионом всегда является специфическим, тогда как катализ гидроксил-ионом может быть специфическим (поскольку в водном растворе нет более сильного основания, чем OH^- -ион) или нуклеофильным.

При нуклеофильном (и электрофильном) как и при общем катализе катализатор входит в переходное состояние субстрата. Различие между этими видами катализа заключается в том, что атака нуклеофильного катализатора направлена на атом углерода карбонильной группы производного карбоновой кислоты, а атака общего основного катализатора – на атом водорода (или в случае общего кислотного катализа – на гетероатом).

Кроме этих видов катализа различают также меж- и внутримолекулярный, моно- и полифункциональный катализ в зависимости от молекулярности и числа каталитических групп, участвующих в реакции.

Таким образом, при наличии в среде основания с pK_a , близким к pH раствора, выражение для наблюдаемой константы скорости гидролиза будет иметь вид:

$$k' = k_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{H}}[\text{H}_3\text{O}^+] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{B}}[\text{B}] + k_{\text{BH}}[\text{BH}].$$

Следует отметить, что некоторые случаи кислотно-основного катализа нельзя различить в силу принципа кинетической эквивалентности. Так, например, реакции

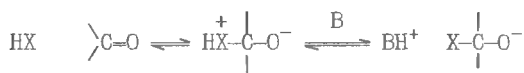


кинетически эквивалентны, поскольку $[\text{A}^-]$, $[\text{AH}]$ и $[\text{OH}^-]$ связаны отношением $[\text{A}^-] = [\text{AH}][\text{OH}^-]K_a/K_w$, где K_a – константа ионизации кислоты; K_w – ионное произведение воды.

Общий кислотно-основной катализ может в принципе происходить по согласованному



и по ступенчатому



механизм. Дженкс [1523] сформулировал правила, по которым согласованный кислотно-основной катализ в водном растворе может быть направлен только на группу, претерпевающую большое изменение pK_a в ходе реакции, и будет происходить, если это изменение превращает термодинамически невыгодный перенос протона в выгодный (см. также: [1524, 1525]).

3.4.2. Каталитическая эффективность

Эффективность кислот и оснований как катализаторов гидролитических реакций зависит от их значений pK_a . Бренстед и Педерсен [1526] предложили простую

зависимость между константами скорости катализируемой реакции и значением pK_a кислоты или основания:

$$\lg k_A = \alpha pK'_a + C \quad \text{и} \quad \lg k_B = \beta pK'_a + C,$$

где k_A и k_B — соответственно константы скорости катализируемой кислотой или основанием реакции, а α , β и C — константы. Существование таких корреляций (рис. 36) вполне понятно, так как при кислотно-основном катализе действие

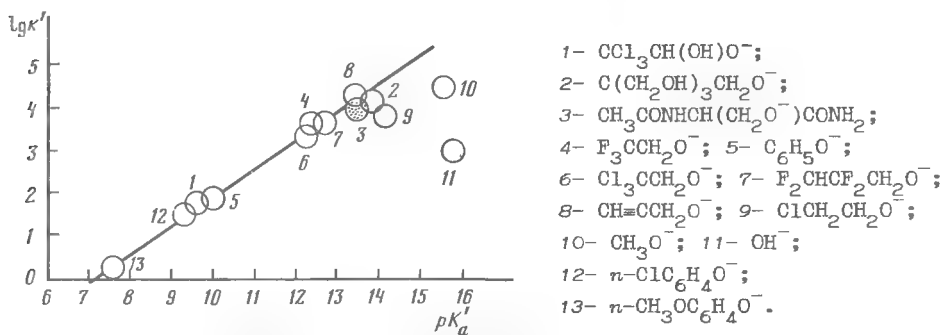


Рис. 36. Бренстедовская зависимость для реакции кислородсодержащих нуклеофилов с *n*-нитрофенилацетатом (H_2O , 25–30°C) [1401, с.115]

катализатора связано с присоединением или отщеплением протона, а pK_a является мерой сродства вещества к протону. Уравнение Бренстеда является примером линейной зависимости свободной энергии и аналогично уравнениям Гаммета, Тафта и др., о которых говорилось в разд. 3.2.1.

Физический смысл уравнения Бренстеда можно пояснить на следующем примере [1423, с.247]. Рассмотрим реакцию переноса протона



где SH — субстрат и В — катализатор. Изменение потенциальной энергии в зависимости от расстояния между HS и В можно представить кривой I (рис. 37). Аналогично изменение потенциальной энергии в реакции $\text{S}^- + \text{BH}$ будет описываться кривой II. Если теперь основание В заменить более слабым основанием В', то соответствующая кривая сместится до II'. Легко видеть, что изменение энергии активации (δE) в этом случае связано с изменением свободной энергии реакции выражением

$$\delta E = \frac{S_1}{S_1 + S_2} \delta \epsilon_o = \beta \delta \epsilon_o,$$

где S_1 и S_2 — наклоны соответствующих кривых в точке пересечения (предполагается, что $S_2 = S_2'$). Полученное выражение — другая форма записи уравнения Бренстеда, из которой ясно, что величина β (и соответственно α) является мерой изменения энергии системы в зависимости от положения протона между атомами субстрата и катализатора в переходном состоянии реакции.

Линейная зависимость между αpK_a и $\lg k$ выполняется лишь в определенном интервале различий между pK_a донора и pK_a акцептора протона [1489]. Этот интервал соответствует механизмам общего основного или кислотного катализа.

Если эти различия очень малы, то $\alpha \rightarrow 1$ ($\beta \rightarrow 0$) и наблюдается специфический кислотный (или основной) катализ. Если же различия очень велики (т.е. перенос идет от слабого основания к сильному с диффузионно контролируемой скоростью), то скорость катализируемой реакции не будет зависеть от pK_a катализатора. Таким образом, определяя зависимость скорости реакции от pK_a катализаторов, можно составить суждение о типе катализа.

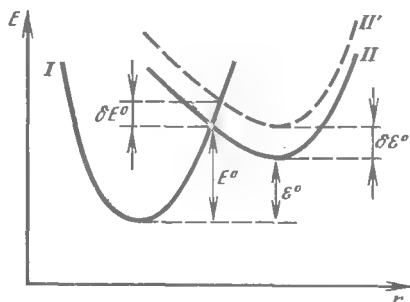


Рис. 37. Интерпретация зависимости Бренстеда [1423, с.247]. Описание см. в тексте

3.4.3. Катализ гидроксильной группой

Гидроксильная группа в виде свободного аниона или в составе воды, спиртов и фенолов может катализировать гидролиз амидов и других производных карбоновых кислот по механизмам специфического (ион OH^-), общего основного и нуклеофильного катализа.

Гидроксилсодержащие соединения являются очень слабыми кислотами, но их сопряженные основания имеют высокие значения pK_a [117]:



R	$pK_{a(1)}$	$pK_{a(2)}$	R	$pK_{a(1)}$	$pK_{a(2)}$
H	15,74	-1,74	C_2H_5	16,0	-2,0
CH_3	15,0	-	C_6H_5	10,0	-6,7

Поэтому гидроксил-ион в случае специфического катализа, а алкоголяты при общем основном катализе выступают в качестве акцепторов протонов. При специфическом основном катализе гидроксил-ионами скорость реакции прямо пропорциональна pH среды. В принципе ион OH^- может генерироваться в растворе любым основанием. Однако перенос протона на более слабое основание, чем гидроксил, происходит с относительно низкой скоростью (см. разд.3.3.3). Если основание участвует в реакции, генерируя гидроксил-ион, то скорость процесса все равно не зависит от концентрации основания. При специфическом катализе существует равновесие



и, кроме того, быстро устанавливается равновесие



Депротонированный субстрат медленно превращается в продукты реакции



Скорость реакции определяется скоростью этого превращения

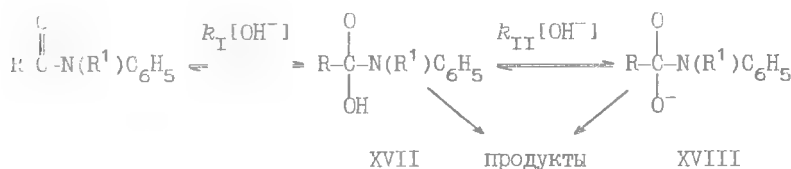
$$v = k[S^-].$$

Так как $K = \frac{[S^-][BH^+]}{[SH][B]}$, то $[S^-] = \frac{K[SH][B]}{[BH^+]}$, но согласно (16) — $[B]/[BH^+] = [OH^-]/K_b$. Следовательно, $v = kK[SH][OH^-]/K_b$, т.е. скорость реакции не зависит от концентрации основания В.

Примеров "чистого" специфического катализа гидроксилсодержащими соединениями реакций гидролиза производных карбоновых кислот довольно мало [1426, 1527, 1528]. В качестве такового можно рассматривать щелочной гидролиз анилидов алифатических кислот [1529], скорость которого пропорциональна как первой, так и второй степени концентрации гидроксил-ионов (19):

$$k' = k_I[OH^-] + k_{II}([OH^-])^2. \quad (19)$$

Второй член в этом уравнении, по-видимому, отражает катализ гидроксил-ионам депротонирования тетраэдрического промежуточного соединения 'XVII' см., однако: [1530]):



Чаще всего гидроксил-ион и ионы алколюатов выступают в гидролитических реакциях как нуклеофильные катализаторы, образуя нестойкие промежуточные продукты присоединения к карбонильному атому углерода.

Способность нуклеофильных реагентов присоединяться к карбонильному атому углерода в целом пропорциональна их основности ($\beta=0,66$), что видно, например, из сопоставления pK_a этих реагентов и их реактивности по отношению к *n*-нитрофенилацетату (см. рис.36). Однако сильноосновные окси-анионы отклоняются от линейной зависимости Бренстеда, по-видимому, вследствие сольватационных эффектов, а также в силу того, что для высокореакционных соединений переходное состояние может достигаться на более ранних фазах процесса (постулат Хеммонда) [1531].

Нуклеофильный катализ гидроксил-ионом, строго говоря, не является истинным катализом, поскольку гидроксил-ион расходуется в процессе гидролиза. Такая реакция нуклеофильно-прототируемый гидролиз. То же самое относится и к реакциям алкоголиза амидов. Однако алкоголиз эфиров является истинным катализом, так как алкоксид-ион, образующийся при реакции, находится в равновесии с алкоксид-ионом, атакующим субстрат.

Истинный катализ алкоголиза амидов наблюдается в тех случаях, когда образующийся сложный эфир гидролизуеться до кислоты со скоростью большей, чем скорость образования эфира:



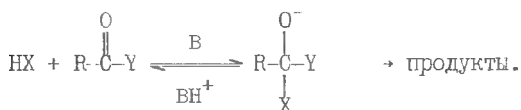


Однако алкоголиз амидов происходит очень медленно, и эта реакция была подробно исследована в противоположном направлении - как аминолиз сложных эфиров [1532, 1533].

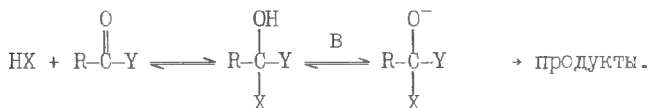
Эффективность нуклеофильного катализа гидроксил-ионом видна из сравнения скорости щелочного гидролиза (см. табл. 24) N-метилацетамида со скоростью некатализируемого (катализируемого водой) гидролиза этого соединения. Каталитическая эффективность ионов OH^- в концентрации 1 М составляет около $1 \cdot 10^9$ (при 25°C).

Окси-анионы могут осуществлять свое каталитическое действие по механизму общего основного катализа [1401]. Аналогично сопряженные им кислоты (спирты, фенолы и т.д.) будут функционировать по механизму общего кислотного катализа. При этом возможно несколько механизмов и соответствующих им кинетических схем.

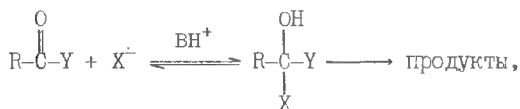
Так, медленная стадия может включать образование тетраэдрического промежуточного соединения и сопровождаться переносом протона:



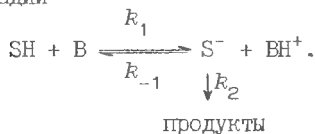
Возможно также быстрое образование тетраэдрического соединения с последующим переносом протона и распадом тетраэдра:



Для общего кислотного катализа возможны механизмы



Тип катализа определяется соотношением констант скоростей индивидуальных стадий



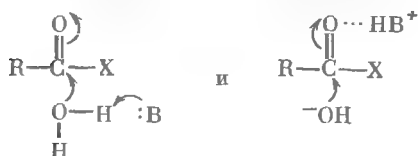
Если $k_1 \approx k_{-1}$ и $k_2 \gg k_{-1}$, т.е. наблюдаемая константа скорости $k' = k_1$, то мы имеем дело с общим катализом. Если же $k_1 \ll k_{-1}$ и $k_2 \ll k_{-1}$, то $k' = k_1 k_2 / k_{-1}$, и это случай специфического катализа.

Кроме того, механизмы общего катализа кинетически трудно отличить от ме-

ханизмов нуклеофильного катализа, поскольку в выражение для скорости во всех случаях входят как концентрация субстрата, так и концентрация катализатора:

$$v = k[\text{SH}][\text{B}]. \quad (20)$$

Более того, возможны случаи, когда механизм общего основного катализа кинетически эквивалентен механизму нуклеофильного катализа с участием сопряженной кислоты катализатора в качестве общего кислотного катализатора (принцип кинетической эквивалентности; см. разд.3.4.1), например:



Так как существует прототропное равновесие



кинетическое уравнение (20) эквивалентно уравнению

$$v = k[\text{BH}^+][\text{OH}^-]. \quad (21)$$

Отличить общий катализ от нуклеофильного можно, проводя реакцию в тяжелой воде (D_2O). Так как при общем катализе стадией, лимитирующей скорость, является стадия, включающая перенос протона, то должно наблюдаться заметное ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} \approx 3$) различие в скорости реакции в D_2O по сравнению со скоростью в H_2O . Как уже отмечалось, интерпретация кинетического изотопного эффекта растворителя встречается с определенными трудностями (см. разд.3.3.3.).

Описано довольно много примеров общего основного и общего кислотного катализа гидролитических реакций эфиров и амидов [1534-1536], а также реакций аминолиза эфиров и тиоэфиров [1537-1539]. В большинстве случаев катализаторами служили относительно слабые окси-анионы и другие основания. Что касается сильных оснований, то они, как правило, функционируют по механизмам нуклеофильного или специфического (гидроксил- и гидроксоний-ионы) катализа.

3.4.4. Тиоловая группа

Тиоловая группа по сравнению со спиртовой имеет значительно более низкое $\text{pK}_a \approx 7-9$. Однако нуклеофильность тиолат-иона в реакциях присоединения к карбонильному углероду почти такая же, как и окси-аниона. Это обусловлено отк-

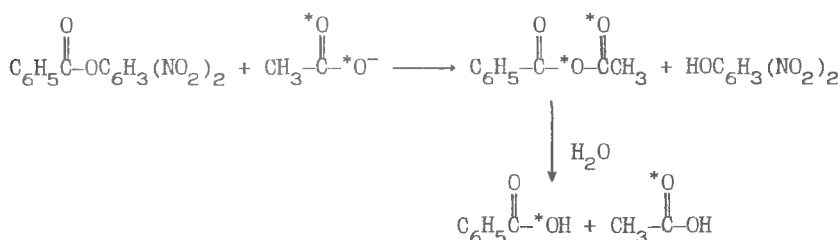
Таблица 28. Тиолиз амидов 2,2,2-трифторэтанолом и алкоголиз амидов *n*-нитрофенолом [1533]

Амид	$k_{\text{SH}}, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$	$k_{\text{RO}^-}, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$	pK_a уходящей группы
CH_3CONHOH	$8,2 \cdot 10^{-7}$	$5,7 \cdot 10^{-10}$	6,17
$\text{CH}_3\text{CONHNH}_2$	$4,5 \cdot 10^{-8}$	$2,8 \cdot 10^{-11}$	8,20
$\text{CH}_3\text{CON} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \quad \text{---} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{O}$	$6,0 \cdot 10^{-10}$	$8,0 \cdot 10^{-13}$	8,87

3.4.5. Карбоксильная группа

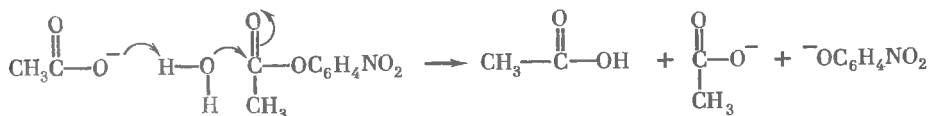
Из-за низкой основности карбоксилат-ионов (pK_a 3–5) их нуклеофильность также оказывается весьма низкой. Скорость катализируемого ацетат-анионом гидролиза *n*-нитрофенилацетата примерно в $1,7 \cdot 10^6$ раз ниже, чем скорость той же реакции, катализируемой гидроксил-ионом (см. рис.36). Поэтому маловероятно, чтобы катализ карбоксилат-ионом проходил по нуклеофильному механизму. Такой тип катализа возможен только при наличии в гидролизуемом соединении очень хорошей уходящей группы, имеющей значение pK_a ниже, чем pK_a катализатора.

Действительно, было показано [1547], что катализируемый ацетат-ионом гидролиз 2,4-динитрофенилбензоата происходит с промежуточным образованием ангидрида, а образующаяся бензойная кислота включает до 75 атомных процентов изотопа ^{18}O , если гидролиз проводить в присутствии меченой ^{18}O уксусной кислоты:



В апротонных растворителях карбоксилат-ион также способен вытеснять ацильную группу из нитрофениловых эфиров, образуя ангидрид [1547]. Нуклеофильный механизм катализа карбоксилат-ионом наблюдается при внутримолекулярных реакциях переноса ацильных групп (см разд.3.4.8).

Однако уже в водных растворах гидролиз *n*-нитрофенилацетата идет, по-видимому, по механизму общего основного катализа карбоксилат-ионом [1548]:



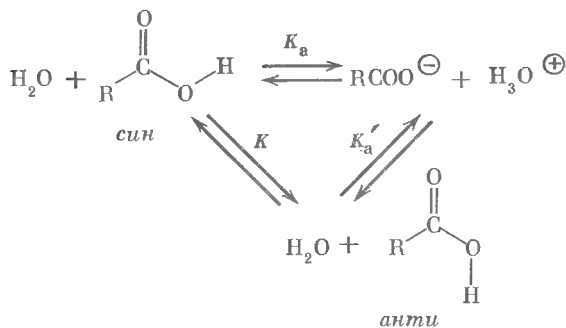
Общий основной и общий кислотный катализ карбоксильной группой зависят как от основности катализатора, так и от чувствительности данной реакции к такому типу катализа, т.е. значений α или β в уравнении Бренстеда. Хотя карбоксилат-ионы – слабые основания, их каталитическое влияние на скорость реакции при данном значении pH может превышать влияние ионов OH^- или H_3O^+ , поскольку концентрация общего катализатора может быть существенно выше, чем концентрация специфических ионов (см. табл.29).

Таблица 29. Доля общего катализа (%) при разных значениях α для системы 0,1 М уксусная кислота–0,1 М ацетат-ион [1546]

α	H_3O^+	CH_3COOH	H_2O
0,1	0,002	2	98
0,5	3,6	96,4	0,01
1,0	99,8	0,2	$5 \cdot 10^{-12}$

Как видно из данных табл.29, в указанной системе при значении $\alpha=0,5$ будет наблюдаться почти исключительно общий кислотный катализ уксусной кислотой.

Следует отметить, что эффективность общего кислотно-основного катализа карбоксильной группой должна зависеть от направления отщепления или присоединения протона [1550]. Поскольку *син*- и *анти*-конформации карбоксильной группы довольно значительно различаются по энергии (около 3,5 ккал/моль в пользу *син*-конформации [1551]), из схемы:

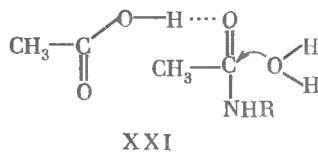
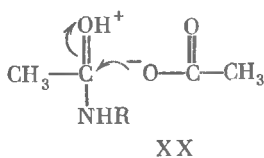
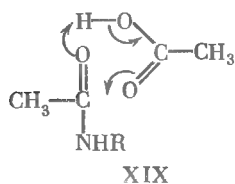


где $K'_a = K_a/K$, ясно, что K'_a должно быть примерно в 10^4 раза выше, чем K_a . Это может особенно эффективно проявляться при внутримолекулярном катализе (см. ниже).

Выявление механизма каталитического участия карбоксильных групп в гидролитических реакциях – довольно сложная задача. Так, исследование гидролиза N-бутилацетамида в ацетатном буферном растворе [1552] показало, что реакция имеет первый порядок по концентрации уксусной кислоты и нулевой порядок по концентрации ацетат-иона. Этим результатам соответствуют два кинетических выражения:



т.е. катализатор может функционировать по согласованному общему кислотному и нуклеофильному механизму (XIX), по механизму нуклеофильной атаки карбоксилат-иона на протонированный амид (XX) или по механизму общего кислотного катализа с нуклеофильной атакой водой (XXI):



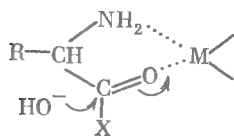
Различить эти механизмы на основании величины кинетического изотопного эффекта D_2O ($k_{H_2O}/k_{D_2O}=2$) не удастся [1401, с.123]. Константы скорости катализируемого ацетат-ионом гидролиза фенилацетата и *n*-нитрофенилацетата укладываются в брэнстедовскую зависимость от pK_a уходящей группы с $\beta \approx 0,25$ [1546]. Это указывает на довольно низкую степень переноса протона в переходном состоянии катализируемого ацетат-ионом гидролиза. Значительно больше

данных имеется по катализируемым карбоксильной группой внутримолекулярным реакциям. Эти сведения будут рассмотрены в разд.3.4.8.

3.4.6. Катализ ионами металлов

Ионы металлов несут положительный заряд и поэтому могут имитировать действие протона в реакциях гидролиза производных карбоновых кислот, т.е. функционировать как "суперкислоты". При этом они могут непосредственно взаимодействовать с карбонильной группой субстрата или же изменять состояние ионизации связанной с ними воды.

Было показано [1553,1554], что ионы двухвалентных металлов эффективно катализируют гидролиз эфиров аминокислот (табл.30). При этом металл координируется со свободной аминогруппой эфира и атомом кислорода карбонильной группы, что приводит к сильной поляризации последней:



Как видно из данных табл.30, эффективность катализа ионами металлов в 10–100 раз превышает эффективность катализа ионами OH^- и на 5–6 порядков эффективнее катализа ионами гидроксония.

То обстоятельство, что катализ ионами металлов обусловлен непосредственным взаимодействием катализатора с реакционным центром, а не является просто следствием появления положительного заряда на аминогруппе эфира, следует из сравнения приведенных в табл. 30 констант скоростей с константой скорости

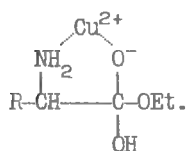
Таблица 30. Катализ ионами металлов, гидроксил- и гидроксоний-ионами гидролиза эфиров аминокислот (25°C)

Субстрат	Катализатор	pH	Растворитель	k' , с^{-1}	k_K , $\text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$ *	Литературный источник
HGlyOMe	Cu^{2+}	7,3	Вода	$42,5 \cdot 10^{-3}$	2,65	[1553]
HPheOEt	Cu^{2+}	7,3	"	$2,67 \cdot 10^{-3}$	0,17	[1554]
HGlyOMe	Co^{2+}	7,9	"	$15,6 \cdot 10^{-3}$	0,975	[1553]
HGlyOMe	Mn^{2+}	7,9	"	$3,51 \cdot 10^{-3}$	0,22	[1553]
HPheOEt	OH	7,3	85%-ный этанол	$5,8 \cdot 10^{-9}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$	[1428]
HPheOEt	H_3O^+	7,3	70%-ный диоксан	$1,46 \cdot 10^{-14}$	$6 \cdot 10^{-6}$	[1555]

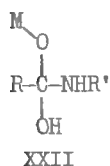
* $k_K = k' / [\text{Me}]$.

ти гидролиза эфира бетаина [1556] $\text{Me}_3^+\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$, которая на три порядка ниже, чем наблюдаемая в присутствии иона меди.

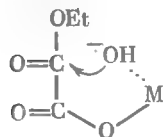
Ионы металлов, очевидно, стабилизируют тетраэдрическое промежуточное соединение в гидролитических реакциях. То, что такое соединение образуется, следует из данных по кислородному обмену в эфирах, меченных по карбонилу ^{18}O [1554]:



Катализ гидролиза амидов при нейтральных pH, когда лимитирующей скоростью стадий является распад тетраэдрического промежуточного соединения, по-видимому, происходит путем координации металла с алкоксидным кислородом (XXII), что облегчает протонирование уходящей группы и разрыв C-N связи [1557]:

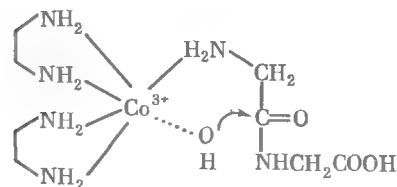


Как известно [1558,1559], ионы металлов образуют комплексы с ионами гидроксидов при нейтральных значениях pH. Поэтому возможен механизм, связанный с повышением концентрации гидроксил-ионов в условиях реакции. Впервые подобный механизм был предложен [1554] для гидролиза моноэфиров дикарбоновых кислот, катализируемого ионами металлов:



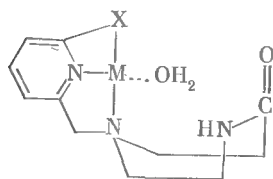
Было показано [1558,1559], что pK_a комплексов металлов с водой близки к 7. Так, pK_a комплекса $(NH_3)_5Co^{3+}OH_2$ равно 6,6, а pK_a $Zn^{2+}OH_2$ -комплекса — около 7.

Известно много примеров катализа ионами металлов [1560-1564]. Один из наиболее впечатляющих примеров катализа такого типа — это гидролиз глицил-глицина в присутствии комплекса этилендиамина с кобальтом [1565]:



В этой реакции дипептид гидролизруется в 10^{10} раз быстрее, чем под действием гидроксил-иона.

Значительные ускорения наблюдались в комплексах двухвалентных металлов типа (XXIII) [1553,1566] и других комплексах металлов с хелатирующими агентами [1567-1569]:



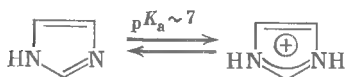
XXIII

Расщепление лактамного цикла в (XXIII) в присутствии Cu^{2+} ускорялось в $1,6 \cdot 10^6$, а в присутствии Zn^{2+} – в $1,9 \cdot 10^5$ раз по сравнению со скоростью в отсутствие ионов металлов.

Следует отметить, что в отличие от сложных эфиров в случае амидов каталитический эффект некоординированных ионов металлов обычно бывает небольшим. Так, гидролиз глицинамида в присутствии $0,02 \text{ M Cu}^{2+}$ лишь в 20 раз быстрее, чем спонтанная реакция [1570], несмотря на то, что медь эффективнее связывается глицинамидом, чем соответствующим эфиром. Это объясняется прочным связыванием в основном состоянии в отсутствие стабилизации переходного состояния реакции, что должно приводить к понижению, а не повышению скорости.

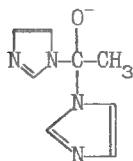
3.4.7. Катализ имидазолом

Имидазол и содержащая эту группу аминокислота – гистидин – являются уникальными кислотно-основными катализаторами, поскольку в физиологических условиях (pH 7) они существуют как в форме кислоты, так и основания:



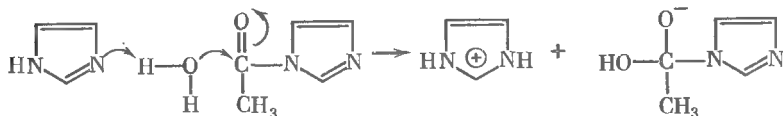
Поэтому имидазол может функционировать в качестве общего основного или общего кислотного катализатора. Кроме того, нуклеофильность имидазольного N-атома достаточно велика, чтобы он мог атаковать атом углерода карбонильной группы, выступая в качестве нуклеофильного катализатора.

Типичным примером общего основного катализа имидазолом является реакция гидролиза ацетилимидазола в имидазоловом буфере. Как оказалось [1571], скорость этой реакции увеличивается при увеличении концентрации буфера при постоянном значении pH. Этот результат нельзя объяснить присоединением имидазола к карбонильной группе, поскольку в этом случае распад тетраэдрического соединения

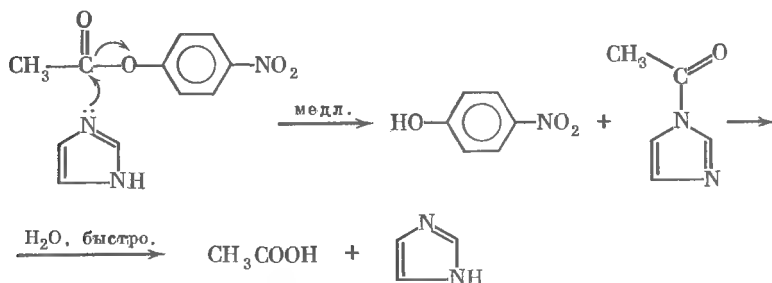


будет приводить к регенерации ацетилимидазола.

Очевидно, что имидазол способствует отщеплению протона от молекулы воды:



Однако катализируемый имидазолом гидролиз *p*-нитрофенилацетата происходит, в основном, по механизму нуклеофильного катализа [1572-1574]. Это следует из спектрофотометрических наблюдений и непосредственного выделения промежуточного соединения - ацетилимидазола [1575]:



Тип катализа имидазолом зависит от характера уходящей группы. Соединения, содержащие слабоосновные ("хорошие") уходящие группы, гидролизуются в присутствии имидазола в основном по механизму нуклеофильного катализа. В случае сильноосновных уходящих групп реализуется общий основной катализ имидазолом и общий кислотный катализ имидазоль-ионом.

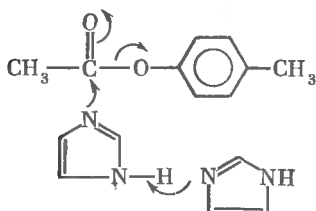
Катализ непротонированными формами замещенных имидазолов подчиняется линейному соотношению Бренстеда [1576]:

$$\lg k = 0,8pK_a - 4,3.$$

Однако низкоосновные имидазолы (например, 4-нитроимидазол, pK_a 1,5) выпадают из такой корреляции. Это связано с тем, что низкоосновные имидазолы при щелочных значениях pH частично находятся в анионной форме:



Известны примеры [1578], когда имидазол одновременно функционирует в качестве как нуклеофильного, так и общего основного катализатора. Например, гидролиз крезилацетата описывается уравнением, содержащим член, пропорциональный квадрату концентрации имидазола. При этом кинетический изотопный эффект реакции равен 2,2. Это объясняется механизмом [1579]:



Общее выражение для скорости катализируемого имидазолом гидролиза эфиров

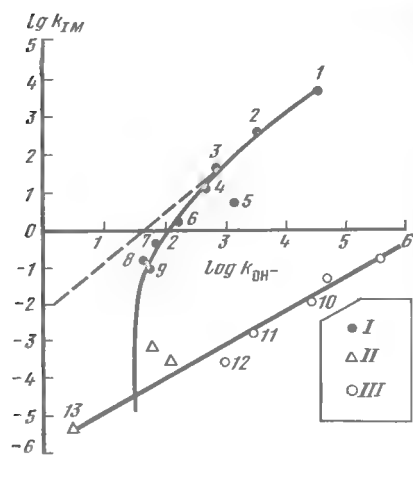


Рис. 38. Зависимость скорости гидролиза эфиров, катализируемого имидазолом, от скорости щелочного гидролиза ($\mu=1,0$; 25°C) [1580]

I- реакции нуклеофильного замещения ацетатов; II- общий основной катализ гидролиза ацетатов; III- общий основной катализ гидролиза метиловых и этиловых эфиров. В случае трифторэтилацетата скорость гидролиза измерялась в присутствии N-метиylimидазола

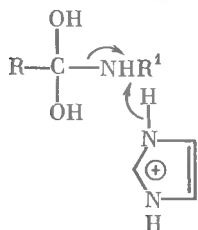
- 1- $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$; 2- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ -2,4;
 3- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_5$; 4- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -m;
 5- $\text{CH}_3\text{CON}(\text{Me})\text{OCOCH}_3$; 6- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{Cl}$ -n;
 7- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_5$; 8- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -n;
 9- $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ -n; 10- $\text{CH}_3\text{COOCH}_3(\text{C}_2\text{H}_5)$;
 11- $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$; 12- NONCOCH_3 ;
 13- $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$

можно представить следующим образом:

$$v = [\text{RCO}_2\text{R}'](k_{\text{H}}[\text{Im}] + k'_{\text{OO}}[\text{Im}] + k_{\text{OO}}[\text{Im}]^2 + k_{\text{A}}[\text{Im}^-]),$$

где k_{H} , k'_{OO} , k_{OO} характеризуют нуклеофильный и общий основной катализ, а k_{A} - катализ имидазолил-анионом. Относительный вклад членов k_{H} и k'_{OO} иллюстрируется зависимостью констант скорости реакций, катализируемых имидазолом ($\lg k_{\text{Im}}$), от скорости щелочного гидролиза ($\lg k_{\text{OH}^-}$) (рис.38).

Протонированная форма имидазола - имидазолий-катион - может функционировать как общий кислотный катализатор [1581,1582], способствуя, например, распаду тетраэдрических соединений:



3.4.8. Внутримолекулярный и полифункциональный катализ

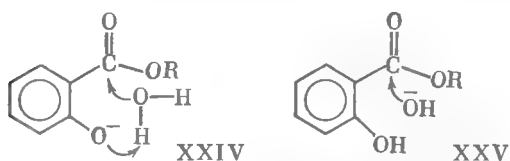
Гидролитическая реакция, катализируемая амидгидролазами, происходит в комплексе фермент-субстрат, т.е. внутримолекулярно. Моделями такой ситуации являются примеры внутримолекулярного моно- и полифункционального катализа в органических соединениях. Примеров такого катализа очень много, и большая часть их суммирована в ряде обзоров [1401,1402,1583-1585]. Здесь мы приведем лишь несколько наиболее иллюстративных случаев с целью последующего сравнения эффективности меж- и внутримолекулярного катализа.

Примером внутримолекулярного участия гидроксильной группы является гидролиз эфиров и амидов салициловой кислоты [1586,1587]. pH-Зависимость скорости гидролиза *p*-нитрофенилового эфира 5-нитросалициловой кислоты характеризуется тремя участками (рис.39): 1) плато при pH 6-10, соответствующим

Рис.39. Зависимость от pH константы скорости гидролиза *n*-нитрофенилового эфира 5-нитросалициловой кислоты [1586]

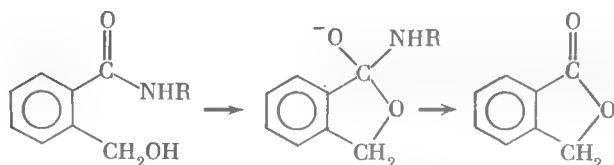
катализируемому водой гидролизу нейтральной молекулы; 2) подъемом и плато в области от слабых до нейтральных значений pH, соответствующим реакции анионной формы молекулы; 3) подъемом в области щелочных pH, соответствующим специфическому катализу гидроксил-ионом.

Реакцию в области pH 6-10 можно рассматривать либо как взаимодействие аниона салициловой кислоты с молекулой воды (XXIV), либо как реакцию нейтральной формы субстрата с гидроксил-ионом (XXV):



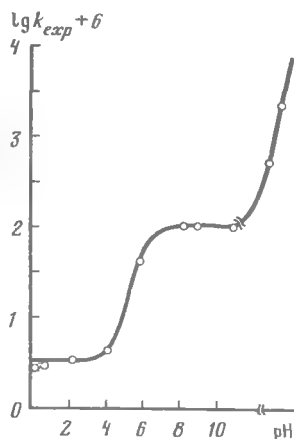
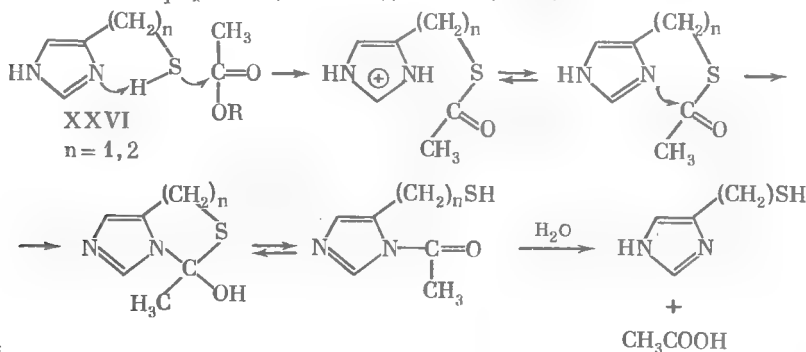
Эти два механизма кинетически эквивалентны. Однако скорость гидролиза соответствующего метокси-аниона в 2000 раз ниже, чем оксисоединения. Если в качестве нуклеофилов использовать имидазол или ион N_3^- , то скорости превращения метокси- и оксисоединений становятся примерно одинаковыми. Отсюда следует, что реакция производных салициловой кислоты идет по механизму общего основного катализа (механизм XXIV) [1586].

Гидроксильная группа может участвовать в реакциях ацильного переноса и как нуклеофил. Так, было показано [1588], что имидазол катализирует реакцию



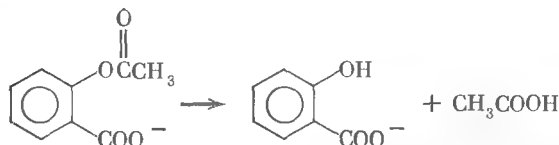
Эта реакция может рассматриваться как пример одновременного внутри- и межмолекулярного катализа, причем имидазол, по-видимому, участвует на стадии распада тетраэдрического промежуточного соединения.

Сходный тип внутри- и межмолекулярного катализа реализуется [1589] при действии на нитрофенилацетат соединения (XXVI):

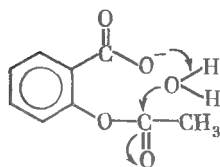


Интересно, что в этом примере тиольная группа выступает как нуклеофильный катализатор, а имидазол – и как общий основной и как нуклеофильный. Скорость этой реакции лишь в 4–5 раз ниже, чем скорость соответствующей реакции, катализируемой α -химотрипсином.

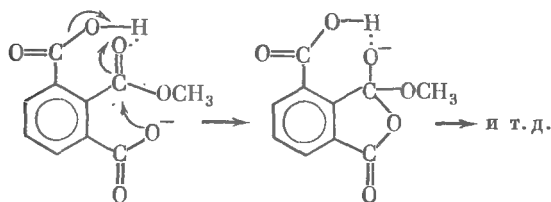
Наиболее изученным примером внутримолекулярного катализа карбоксильной группой является гидролиз аспирина [1590, 1591]:



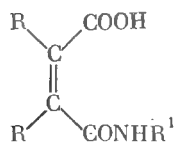
Эта реакция одно время рассматривалась как пример нуклеофильного участия карбоксилат-иона в гидролизе на том основании, что при проведении реакции в $H_2^{18}O$ наблюдалось включение изотопа кислорода в карбоксильную группу салициловой кислоты [1590]. Однако впоследствии [1591] эти данные были опровергнуты. Изучение [1592] гидролиза замещенных аспиринов позволило выявить эффекты заместителей на свойства карбоксильной и эфирной группы в отдельности ($\rho_{\text{карб}} = -0,52$ и $\rho_{\text{эф}} = 0,96$). Эти исследования привели к выводу, что участие карбоксильной группы заключается в общем основном катализе карбоксилат-ионом:



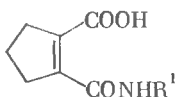
В случае гидролиза метилового эфира 2,6-дикарбоксибензойной кислоты характер каталитического участия карбоксильных групп зависит от состояния их ионизации [1593]. В моноанионе этого соединения одна группа (ионизованная) участвует как нуклеофильный катализатор, а другая – как общая кислота:



Известен еще ряд примеров внутримолекулярного катализа карбоксильной группой, где эта группа участвует как нуклеофильный катализатор [1594–1598]. Особенно эффективным является гидролиз 2,3-диметилмалеамовых кислот (XXVIIa) [1583, 1597]. При pH 3 эти соединения гидролизуются в 10^8 – 10^9 раз быстрее, чем N-метилацетамид, и в 16 000 раз быстрее, чем соединение, не содержащее метильных групп (XXVIIб). Однако амид циклопентен-1,2-дикарбоновой кислоты (XXVIII) гидролизуется медленнее, чем соединение (XXVIIс):



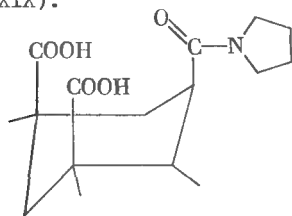
XXVII



XXVIII

α : $R=CH_3$; σ : $R=H$.

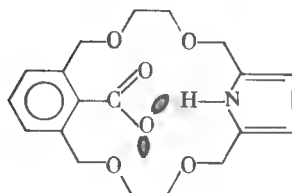
Интересным примером нуклеофильного катализа является гидролиз амида (XXIX):



XXIX

В этом соединении карбоксильный кислород расположен над плоскостью амид-ной связи на расстоянии 2,8 Å, причем одна из групп способствует отщеплению протона. Эффективная молярность в этой реакции (см. ниже) превышает 10^{14} M [1599]. Каталитическая роль карбоксилат-иона может быть связана с электростатической стабилизацией участвующего в реакции катиона, например имидазо-лия [1600].

Особенность катализа карбоксильной группой заключается в отмеченном выше различии основности *син*- и *анти*-конформаций. Большинство моделей внутримолекулярного катализа характеризуется *анти*-конформацией карбоксилат-иона. Построение моделей, в которых этот ион участвует в переносе протона на и от остатка имидазола в *син*-конформации (например, XXX) показало, что в этом случае pK_a имидазола повышается на 1,5 единицы [1601,1602]:

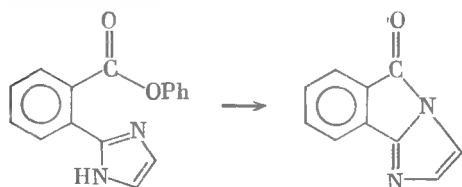


XXX

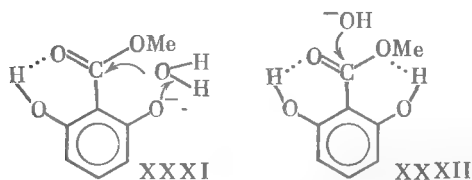
Известно много примеров внутримолекулярного катализа ионами металлов. При этом металл может способствовать катализу другой, например карбоксильной, группой, стабилизируя благоприятную для этого конформацию, а также промотировать катализ OH^- -ионами или водой [1603-1605].

Внутримолекулярный катализ имидазолом, как и межмолекулярный, происходит по разным механизмам в зависимости от pK_a уходящей группы [1606,1607]. Так, гидролиз метилового эфира 2-имидазолилбензойной кислоты происходит по меха-

низму общего основного катализа имидазолом, а фениловый эфир гидролизуется с образованием трициклического соединения [1608]:



Еще один пример бифункционального катализа – это гидролиз метилового эфира 2,6-доксибензойной кислоты [1609]. Фенольные оксигруппы в этом соединении участвуют в расщеплении эфирной связи по кинетически эквивалентным механизмам (XXXI) или (XXXII):



Это соединение гидролизуется в 10^5 – 10^6 раз быстрее, чем 2,6-диметилбензоат.

Сравнение эффективности внутри- и межмолекулярного катализа (табл.31) встречается с рядом трудностей. Во-первых, это возможное различие в механизмах катализа. Так, ацетат-ион в межмолекулярных реакциях обычно функционирует как общий катализатор, а во внутримолекулярных может выступать как нуклеофильный реагент. Во-вторых, не всегда удастся провести сравнение в одинаковых условиях. Далее, внутримолекулярный катализ очень чувствителен к конформации субстрата [1610]. Наконец, оба типа катализа отличаются порядком реакции.

Обычно эффективность внутримолекулярного катализа выражают в эффективной

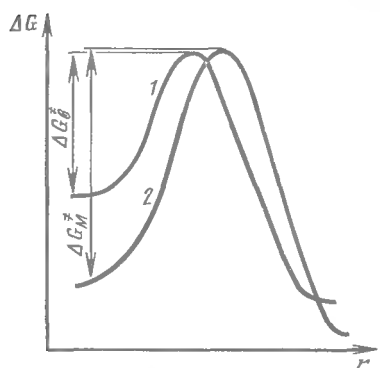


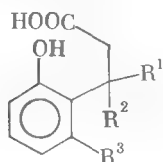
Рис.40. Изменение свободной энергии по координате (r) реакции для внутримолекулярной (1) и межмолекулярной (2) реакций

молярной концентрации каталитических групп. Долгое время считалось, что эффективная концентрация соседних групп не может превышать 55 М [1615], т.е. концентрации воды в воде. Однако, как показали работы Пейджа и Дженкса [1616,1617], максимальная эффективная концентрация соседней группы может достигать $6 \cdot 10^9$ М. Это обусловлено ограничением при внутримолекулярных реакциях поступательных и вращательных степеней свободы реагирующих групп, вследствие чего свободная энергия основного состояния в этих реакциях выше, чем в межмолекулярных процессах. При одном и том же или близком уровне свободной энергии переходного состояния это приводит к понижению активационного барьера (рис. 40) [1578].

Таблица 31. Сравнение констант скорости внутримолекулярного (k_1) и межмолекулярного (k_2) катализа

Субстрат	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	$k_1/k_2, \text{М}$	Литературный источник
	$83,8 \cdot 10^{-6}$	—	8,2	[1590]
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_5$	—	$10,2 \cdot 10^{-6}$		[1546]
	$5,9 \cdot 10^{-5}$		49	[1611]
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{C}_6\text{H}_4-\text{COOCH}_3$		$1,2 \cdot 10^{-6}$		[1611]
	0,043		24	[1612]
 + $\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_5$	—	$0,18 \cdot 10^{-2}$		[1572]
$\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2^{-n}$ CH_2COO^-	0,8		$2 \cdot 10^5$	[1613]
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2^{-n}$		$4 \cdot 10^{-6}$		[1613]
	0,02		$2 \cdot 10^8$	[1614]
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OCOCH}_3 + \text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$	—	$1 \cdot 10^{-10}$		[1614]
	1,04		$6,5 \cdot 10^9$	[1583]
$\text{CH}_3\text{CONHPr} + \text{CH}_3\text{COO}^-$	—	$1,6 \cdot 10^9$		[1552]

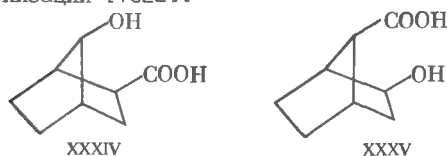
Роль энтропийных факторов видна из приведенных выше примеров внутримолекулярного катализа, а также из примеров реакций лактонизации в стерически затрудненных кислотах типа (XXXIII) [1618-1621]:



XXXIII

Лактонизация вещества (XXXIII; $R_1=R_2=R_3=CH_3$) происходит в $\approx 5 \cdot 10^{10}$ быстрее, чем лактонизация не содержащего метильных групп соединения (XXXIII; $R_1=R_2=R_3=H$). По сравнению с реакцией образования эфирной связи из фенола и уксусной кислоты эффективная концентрация соседних групп здесь увеличивается примерно на 15 порядков!

При этом, по-видимому, допустима определенная свобода внутреннего вращения реагирующих групп. Во всяком случае ангулярное смещение примерно на 10° при переходе от соединения (XXXIV) к (XXXV) не сказывается на скорости лактонизации [1622]:



В реальных системах, однако, уровень свободной энергии переходного состояния меж- и внутримолекулярной реакции редко остается одинаковым из-за различий в механизмах катализа.

Эффективность полифункционального межмолекулярного катализа обычно не намного выше, чем эффективность монофункционального катализа тем же соединением. Это обусловлено увеличением порядка реакции в первом случае, что приводит к уменьшению энтропии активации реакции: Такое уменьшение энтропии компенсирует уменьшение энтальпии, и свободная энергия активации остается почти неизменной [1623]. Для того чтобы реализовать эффективный полифункциональный катализ, необходимо, не изменяя порядка реакции, увеличить число каталитически функционирующих групп, т.е. реализовать внутримолекулярный полифункциональный катализ. Однако и в этом случае остаются ограничения, обусловленные возможностями синхронизации элементарного акта химического превращения.

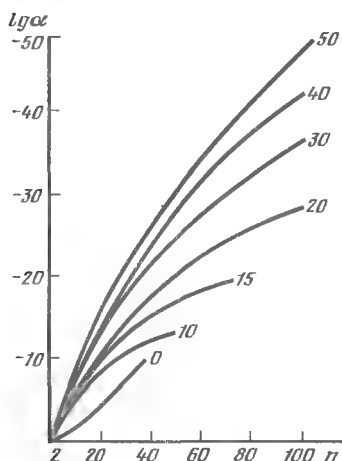
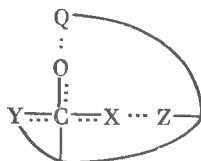


Рис. 41. Зависимость фактора синхронизации (α) от числа степеней свободы (n) для элементарных актов с различной энергией активации синхронной реакции (указана у кривых в ккал/моль) [1625]

Действительно, если полифункциональная внутримолекулярная реакция происходит в одном элементарном акте, образуя сложное переходное состояние типа:



то такая реакция требует реализации синхронных колебаний нескольких тяжелых атомов по координате реакции. Теоретическое рассмотрение этой проблемы [1624–1626] показало, что в этом случае в выражение для константы скорости необходимо вводить поправку на так называемый коэффициент синхронизации α , т.е.

$$k = \frac{KT}{h} \alpha e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}, \quad \text{где } \alpha = \frac{n}{2^{n-1}} \frac{nKT}{\pi E_c} \frac{n-1}{2};$$

n – общее число степеней свободы m реагирующих атомов: $n=(3m-6)$; E_c – энергия активации синхронного процесса. На рис.41 показаны значения α при различных n и E_c . Видно, что уже для малых значений E_c при $n=18$ (т.е. $m=8$) величина α будет вносить значительный отрицательный вклад в наблюдаемую константу скорости.

3.4.9. Мицеллярный катализ

Еще один вид катализа, имеющий отношение к функционированию ферментов, это мицеллярный катализ. Липофильные вещества могут концентрироваться внутри мицеллярной фазы, и если эта фаза содержит функционально активные группировки, то реакция будет происходить более эффективно, чем в гомогенном растворе. Например, n -нитрофенилацетат гидролизуеться щелочью или в присутствии этиламина быстрее, чем n -нитрофенилдеканонат [1627]. Однако в смешанных мицеллах n -нитрофенилдеканоната и дециламина скорость гидролиза сложноэфирной связи примерно в 100 раз превосходит скорость гидролиза n -нитрофенилацетата тем же амином (табл.32).

Таблица 32. Константы скорости гидролиза n -нитрофенилацетата и n -нитрофенилдеканоната в смешанных мицеллах

Субстрат	Щелочь $k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	Этиламин $k_2, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	Дециламин $k_2, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	k_3/k_2
n -Нитрофенилацетат (XXXVI)	9,45	5,74	39,1	6,8
n -Нитрофенилдеканонат (XXXVII)	1,19	0,19	133	700
$k(\text{XXXVII})/k(\text{XXXVI})$	0,13	0,033	3,4	100

Причины эффективности мицеллярного катализа становятся понятными при кинетическом анализе этого явления [1628,1629]. Субстрат в растворе, содержащем мицеллярную фазу, распределяется между фазами



где P – константа равновесия, а индексы w и m означают соответственно водную и мицеллярную фазы. В воде и в мицеллах протекают реакции:



где n – кинетический порядок реакции.

Наблюдаемая скорость будет

$$k' = \frac{k_m P^n C V + k_w (1 - C V)}{(1 + K C)^n}, \quad (25)$$

где C – концентрация поверхностно-активного вещества; V – его молярный объем; $K = (P-1)V$. При $k' \gg k_w$ величина ускорения равна

$$(k'/k_w)_{\max} = \frac{k_m}{k_w} \frac{(n-1)^{n-1}}{n^n} P^{n-1}. \quad (26)$$

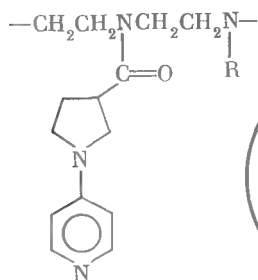
Из формулы (26) видно, что эффективность является произведением двух параметров: k_m/k_w показывает, насколько эффективнее происходит реакция за счет изменения состава среды, ориентационных и стабилизирующих переходное состояние факторов и $(n-1)^{n-1}P^{n-1}/n^n$ характеризует эффект концентрирования реагентов. Этот эффект сильно зависит от порядка реакции. Таким образом, мицеллярный катализ может быть весьма эффективен для реакций высокого порядка.

Были исследованы многочисленные системы, содержащие различные поверхностно-активные вещества в качестве мицеллярной фазы и разные нуклеофильные группы (см. обзоры: [1628, 1630, 1631]). Наблюдаемые ускорения достигали 10^4 – 10^5 [1632, 1633].

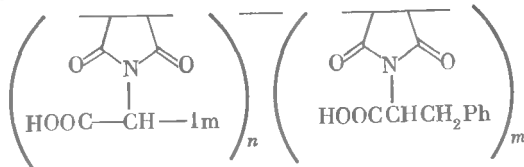
Использование зантиомерных мицеллярных катализаторов позволяет моделировать стереоспецифичность [1634, 1635], комплексообразование, ацилирование и деацилирование катализатора [1636, 1637], а также другие особенности ферментативного катализа. Каталитические эффекты наблюдаются при гидролизе не только эфиров, но и амидов (анилидов) [1638].

3.4.10. Макромолекулярные модели анидгидролаз

Полимерные катализаторы проявляют многие свойства, характерные для ферментов. Среди первых таких катализаторов были поли-4-винилпиридин и поли-N-винилимидазол [1639, 1640]. Гидролиз этими полимерами замещенных нитрофенилацетатов проявляет типичную колоколообразную pH-зависимость. Весьма эффективными оказались полимеры на основе полиэтиленimina, содержащие различные каталитически активные группы [1641, 1642]. Так, полимеры типа (XXXVIII) гидролизуют *n*-нитрофенилкапроат с константой скорости $6,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, причем наблюдается быстрое ацилирование катализатора с последующим более медленным деацилированием. Были предложены полимерные катализаторы, содержащие несколько разных функциональных групп [1643].



XXXVIII

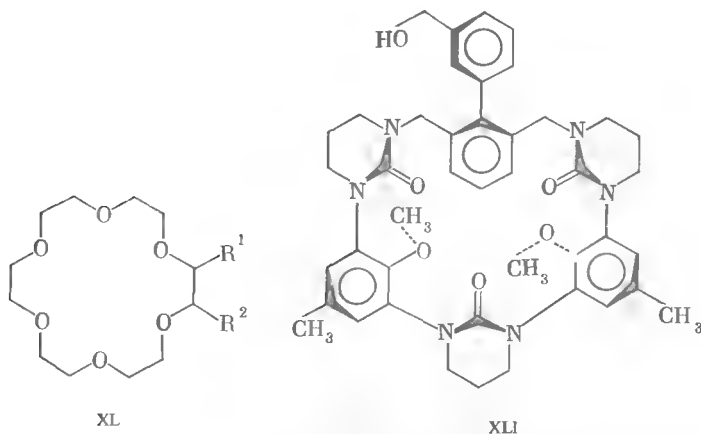


XXXIX

Полиэлектролиты – сополимеры стирола с малеимидами гистидина и фенилаланина (XXXIX) – способны образовывать комплексы с белками (казеин) и катали-

зировать гидролиз амидной связи [1644,1645].

Другой тип моделей амидгидролаз, хотя и не относится формально к макромолекулярным соединениям, но близок им по способности образовывать комплексы с субстратом. Речь идет о краун-эфирах (XL) и близких им по структуре соединениях [1646]:

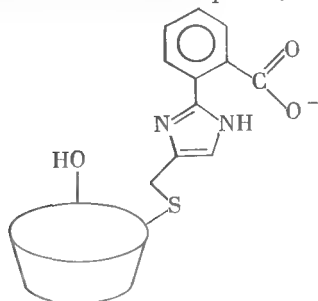


XL

XII

Эти эфиры способны связывать ионы металлов и заряженные группы (например, ион аммония), а боковые цепи могут содержать каталитически активные группировки. Связывание хиральных молекул является стереоспецифичным. Впечатляющим примером является ацилирование макроцикла (XII) *n*-нитрофениловым эфиром аланина [1647]. По сравнению с переносом ацильного остатка на 3-фенилбензиловый спирт перенос его на вещество (XII) ускоряется в 10^{11} раз.

Еще один тип искусственных катализаторов гидролитических реакций – это α , β - и γ -циклодекстрины (рис.42) – циклические олигомеры глюкозы соответственно из шести, семи или восьми остатков. Циклодекстрины связывают небольшие молекулы и могут быть модифицированы введением функциональных групп [1402,1648]. Гидроксильные группы циклодекстринов ацилируются при связывании в полости катализатора *n*-нитрофениловых эфиров. Ацильная группа затем отщепляется, по-видимому, при участии в катализе этого процесса соседних гидроксильных групп. Скорость ацилирования в некоторых случаях сравнима со скоростью гидролиза *n*-нитрофенилацетата химотрипсином [1649]. Очень близкая по свойствам модель этого фермента была получена в 1985 г. (XIII). Это соединение, названное β -бензимом, катализирует гидролиз *m*-третбутилфенилацетата с константой скорости, близкой к ферментативной [1650]:



XIII

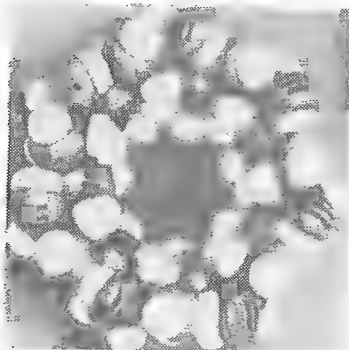


Рис. 42. Модель циклоокта-амилозы (γ -циклодекстрина) [1648]

Следует отметить, что β -бензим существенно более устойчив к pH и температуре, чем химотрипсин [1651].

Была предпринята попытка получить гибридный белок со свойствами амидгидролазы путем экспрессии в *Escherichia coli* гена, кодирующего в рамке считывания галактокиназы семь повторов октапептида GluAlaHisAlaSerPhePhePhe [1652]. Этот белок катализирует гидролиз *n*-нитрофенил-ацетата со скоростью в 1000 раз превышающей скорость гидролиза того же субстрата трипептидом SerHisAsp. Анализ связывания трипсином бензамидина и бычьего панкреатического трипсинового ингибитора (БПИ) позволил предложить

структуру синтетического 26-членного пептида, моделирующего участок связывания фермента [1653]. Полученный пептид связывал бензамидин и БПИ, реагировал с диизопропилфторфосфатом, но не обладал каталитической активностью. Характерно, что подавляющее большинство моделей ферментов весьма эффективно в отношении *n*-нитрофениловых эфиров, но, как правило, не активно в отношении амидных субстратов. Этот "синдром *n*-нитрофениловых эфиров" [1654], по крайней мере в случае циклодекстринов, объясняется тем, что ацил- β -циклодекстрины имеют высоко энергетическую *S*-*цис*-конформацию эфирной группы, и O^- -анион циклодекстрина является лучшей уходящей группой, чем алкокси- и аминогруппы.

3.5. Заключение

Отмеченные ранее особенности электронной структуры амидной группы - стабильность и чувствительность к внешним воздействиям - определяют низкие скорости некатализируемого расщепления амидов и существование многочисленных типов катализа, заметно облегчающих реакцию гидролиза. Важнейшим и наиболее энергоемким процессом является резонансная дестабилизация амида, т.е. воздействия, направленные на снижение порядка связи C-N. Это достигается или протонированием карбонильной группы (кислотный катализ), или повышением заряда на атакующей карбонильный углерод молекуле (основной катализ), а также способностью амидной группы к внеплоскостной деформации без больших энергетических затрат. Сам акт нуклеофильной атаки, по видимому, является согласованным процессом в том смысле, что чем сильнее отрицательно заряженная группа приближается к карбонильному углероду, тем эффективнее происходит перераспределение электронной плотности, уменьшающее резонансную стабилизацию. Атака нуклеофила завершается, как правило, образованием неустойчивого тетраэдрического промежуточного соединения, направление распада которого определяется как его конформацией, так и свойствами связанных с тетраэдрическим углеродом заместителей. На этой стадии распад в направлении продуктов ускоряется по типу общего кислотно-основного катализа. Катализ особенно эффективен, если он происходит внутримолекулярно. При этом важное значение имеет взаимное расположение реагирующих атомов. В наиболее благоприятных случаях наблюдаемая величина ускорения близка той, которая достигается при ферментативном катализе.

Две особенности отличают ферменты от небиологических катализаторов – эффективность и специфичность. Хотя в моделировании биокатализа достигнуты заметные успехи, все же в полной мере воспроизвести эти особенности ферментов на моделях до сих пор не удалось. В этой главе будет приведен основной фактический материал, касающийся эффективности и специфичности амидгидролаз.

4.1. Ферментативная кинетика

Как и всякий катализатор, фермент может проявлять свое действие в концентрациях, существенно более низких, чем концентрация субстрата. В этих условиях можно различить три фазы реакции: 1) предстационарную, когда концентрация свободного фермента резко падает (обычно до нуля при $[S]_0 \gg [E]_0$); 2) стационарную, когда скорость реакции почти не меняется во времени; 3) постстационарную, когда скорость реакции убывает во времени из-за значительного снижения концентрации субстрата (см. обзоры: [1613, 1655–1661]).

4.1.1. Стационарная кинетика

Обычно скорость ферментативной реакции измеряют на стационарной стадии. При этом концентрация субстрата и всех промежуточных продуктов изменяется пренебрежимо мало по сравнению с начальной концентрацией. Условие стационарности выполняется при степени превращения субстрата, не превышающем 10–15% (рис. 43).

Если увеличить начальную концентрацию субстрата, то в отличие от неферментативных реакций скорость процесса в конечном счете достигает постоянной величины и далее уже не зависит от концентрации субстрата. При этом достигается насыщение фермента субстратом и скорость реакции становится максимальной. Явление насыщения указывает на то, что фермент и субстрат образуют комплекс, и этот последний претерпевает химическое превращение:



Образование фермент-субстратного комплекса является обратимым процессом, причем реагенты удерживаются в нем силами нековалентной природы. Существует множество физико-химических и прямых рентгеноструктурных данных, подтверждаю-

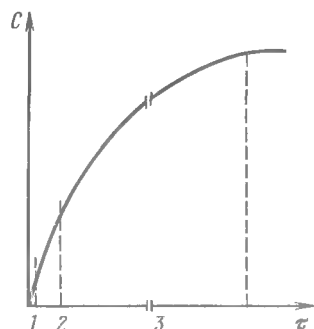


Рис. 43. Зависимость концентрации продукта ферментативной реакции от времени
1 – предстационарная стадия; 2 – стационарная стадия; 3 – постстационарная стадия

щих образование таких комплексов (см. гл.6).

Выражение для скорости превращения субстрата, соответствующее схеме (1), хорошо известно как уравнение Михаэлиса-Ментен [1662]:

$$\frac{dP}{dt} = v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0}, \quad (2)$$

где $K_m = k_{-1}/k_1$ называют константой Михаэлиса. При выводе этого уравнения предполагается, что распад комплекса ES в направлении исходного субстрата происходит во много раз быстрее, чем его химическая трансформация, т.е. $k_{-1} \gg k_2$. Если не вводить это допущение, то, как показали Бриггс и Холден [1663], значение $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$. В более сложных случаях выражение для K_m становится еще более сложным. Поэтому предложено [1664, 1665] обозначать константу диссоциации фермент-субстратного комплекса как субстратную константу $K_s = k_{-1}/k_1$, а во всех остальных случаях величину, входящую в знаменатель уравнения (2), называть константой Михаэлиса и обозначать как K_m или K'_m , где знак "прим" указывает на экспериментальное (кажущееся) значение. Величина константы скорости химического превращения также может быть сложной величиной. Обычно ее называют каталитической константой (k_{cat}), она имеет размерность константы скорости первого порядка. Для схемы (1) $k_{cat} = k_2$ и характеризует число молекул субстрата, превращающегося в продукт в единицу времени (число оборотов).

Легко видеть, что когда в уравнении (2) $K_m \gg [S]_0$, оно принимает вид

$$v = k_{cat} [E]_0 [S]_0 / K_m. \quad (3)$$

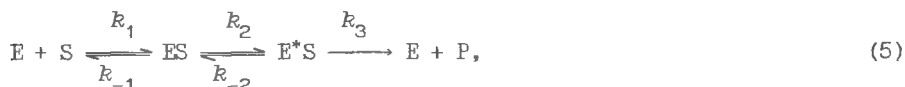
Величина k_{cat}/K_m является константой скорости второго порядка для реакции фермента с субстратом.

Если выполняется соотношение $K_m \ll [S]_0$, то скорость реакции становится равной максимальной скорости:

$$v = V_{max} = k_{cat} [E]_0, \quad (4)$$

а при условии $K_m = [S]_0$ $v = 0,5 V_{max}$, т.е. константа Михаэлиса соответствует такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной скорости.

Мы рассмотрели здесь простейшую схему односубстратной реакции, подчиняющейся кинетике Михаэлиса-Ментен. Более общими являются случаи, когда на пути от субстрата к продукту существует несколько промежуточных комплексов. Например, если имеются последовательно образующиеся два комплекса (за счет изомеризации ES в E*S)

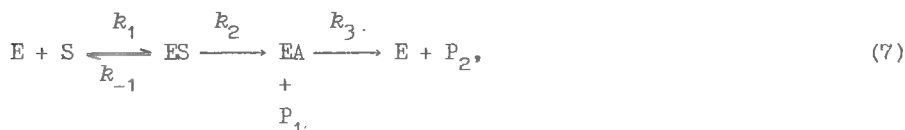


то выражение для скорости будет иметь вид

$$v = \frac{k_3 K_P [E]_0 [S]_0}{K_m + (1 + K_P) [S]_0}, \quad (6)$$

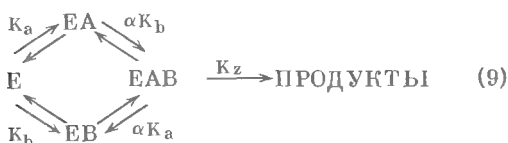
где $K_P = \frac{k_2}{k_{-2}+k_3}$ и $K_m = \frac{k_{-1}+k_3}{k_1}$.

Если фермент-субстратный комплекс претерпевает последовательные химические превращения [1666]



$$\text{то } v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_m \frac{k_3}{k_2 + k_3} + [S]_0}. \quad (8)$$

Реакции, катализируемые амидгидролазами, являются фактически односубстратными, поскольку изменением концентрации воды можно всегда пренебречь. Однако иногда возникает необходимость анализировать двухсубстратные превращения, катализируемые ферментами этого класса. В частности, это относится к обратным реакциям синтеза пептидной связи и к реакциям транспептидации (см. разд.4.8). Два субстрата могут присоединяться к ферменту независимо (неупорядоченный механизм)



или последовательно (упорядоченный механизм)



В зависимости от последовательности присоединения субстратов А и В и последовательности отщепления продуктов различают несколько типов упорядоченных механизмов ("пинг-понг", механизм Теорелла-Чанса и др.; см.: [1660]).

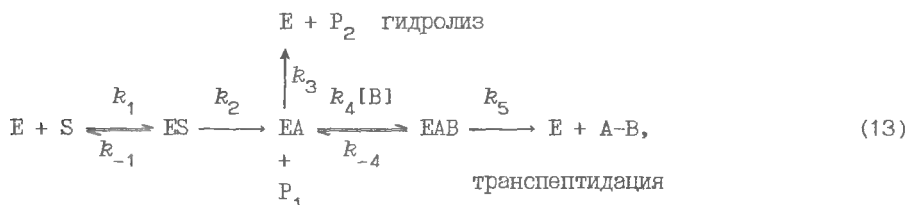
При условии быстрого установления равновесия, т.е. когда химические стадии идут медленнее, чем образование комплексов, общее выражение для скорости неупорядоченной двухсубстратной реакции дается уравнением

$$v = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{\alpha K_A}{[A]_0} + \frac{\alpha K_B}{[B]_0} + \frac{\alpha K_A K_B}{[A]_0 [B]_0}}. \quad (11)$$

Для упорядоченного механизма (10) выражение для скорости будет

$$v = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{K_B}{[B]_0} + \frac{K_A K_B}{[A]_0 [B]_0}}. \quad (12)$$

Примером двухсубстратной реакции, катализируемой протеолитическими ферментами, является реакция транспептидации



где В - акцептор транспептидации.

Если имеется возможность определить концентрацию продукта транспептидации в начальный период реакции, то выражение для скорости его образования (v_t) будет [1667]

$$v_t = \frac{k_5 [E]_0 [S]_0 [B]_0}{K_T \frac{k_3}{k_2} (K_m + [S]_0) + [B]_0 \frac{k_5}{k_2} (K_m + [S]_0) + [B]_0 [S]_0}, \quad (14)$$

где $K_T = \frac{k_{-4} + k_5}{k_4}$, а для скорости гидролиза (v_h)

$$v_h = \frac{k_3 K_T [S]_0 [E]_0}{K_T \frac{k_3}{k_2} (K_m + [S]_0 + [B]_0) + [B]_0 \frac{k_5}{k_2} (K_m + [S]_0) + [B]_0 [S]_0}. \quad (15)$$

Для вывода уравнений ферментативной кинетики используется метод детерминантов Кинга-Альтмана [1668], а также различные формализованные методы, основанные на теории графов [1669-1671].

4.1.2. Методы определения кинетических параметров

Чтобы получить численные значения кинетических параметров, входящих в уравнения, приведенные в разд. 4.1.1, необходимо определить начальные скорости превращения субстрата в зависимости от его концентрации. Анализ этих зависимостей чаще всего проводится графически путем преобразования уравнений скорости в линейную форму. Так, по методу Лайнуивера-Берка [1672] линейным преобразованием уравнения (2) будет

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_{cat} [E]_0} + \frac{K_m}{k_{cat} [E]_0} \cdot \frac{1}{[S]_0}. \quad (16)$$

Строя зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$, получают графики типа, представленного

Рис. 44. Определение кинетических параметров ферментативных реакций по методу Лайнуивера-Берка (а) [1672] и Иди-Хофсти (б) [1673]

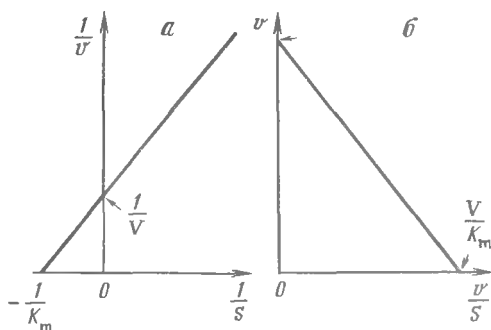
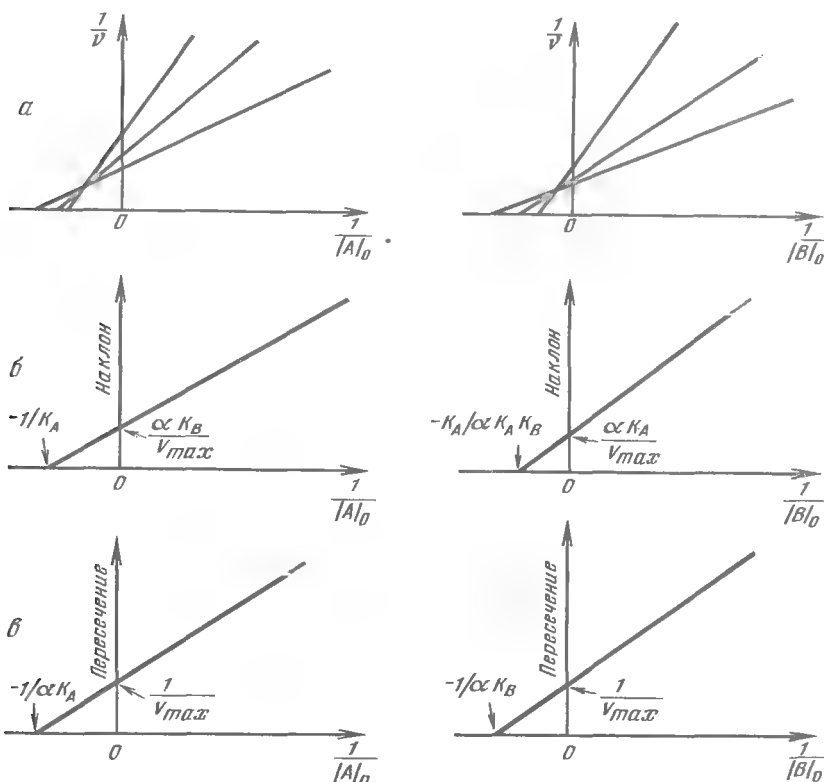


Рис. 45. Определение кинетических параметров двухсубстратных ферментативных реакций
а - первичные и б, в - вторичные графики



на рис. 44, а. Точки пересечения прямой с осями координат дают значения $k_{\text{cat}}[E]_0$ и K_m .

Другой способ линеаризации уравнений типа (2) предложен Иди и Хофсти [1673] (рис. 44, б):

$$v = k_{\text{cat}}[E]_0 - K_m \frac{v}{[S]_0}. \quad (17)$$

Оценка точности определяемых значений кинетических параметров в этих и других типах линейных представлений уравнения Михаэлиса-Ментен дана в [1674-1677].

Анализ двухсубстратных реакций проводится обычно путем измерения скорос-

ти в зависимости от концентрации одного из субстратов при фиксированных концентрациях второго субстрата. Вид графиков в двойных обратных величинах (рис.45) позволяет во многих случаях отличить упорядоченный механизм от неупорядоченного, а из вторичных зависимостей величин отсекаемых отрезков от концентрации второго субстрата – получить значения кинетических констант двухсубстратной реакции.

Практические методы измерения начальных скоростей реакций и анализа кинетических уравнений приведены во многих руководствах [1613,1659].

В результате такого анализа получают значение кажущейся константы Михаэлиса, смысл которой зависит от типа кинетического механизма (см. разд. 4.1.3), и максимальную скорость $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$.

Уравнение (2) можно представить в интегральной форме:

$$\frac{[P]}{t} = V_{\max} - \frac{K_m}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]},$$

где $[P]$ – концентрация продукта в момент времени t . Анализ этого уравнения проводят [1678], строя зависимости $[P]/t$ от $1/t \cdot \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}$. Получающаяся прямая имеет тангенс угла наклона, равный K_m , и отсекает на оси ординат отрезок, равный $V_{\max}$. Предложены интегральные уравнения и для более сложных случаев (см., например: [1679]), а также ряд способов анализа полной кинетической кривой ферментативной реакции [1680,1681].

Определение активности амидгидролаз. Титрование активных центров. Чтобы из значений максимальной скорости получить величину k_{cat} , необходимо знать концентрацию активных центров фермента. Это последнее значение определить не всегда просто, и оно известно лишь для ограниченного числа амидгидролаз.

Для определения абсолютной концентрации активных центров ферментов предложено несколько методов [1402]. Одна группа методов основана на применении необратимых (или квазиобратимых) ингибиторов, селективно реагирующих с активными центрами исследуемого фермента. Если ингибитор содержит хромогенную или радиоактивную метку, то, отделив модифицированный белок и определив содержание метки, можно рассчитать концентрацию активных центров при условии, что известна молекулярная масса белка. Недостатком этого метода является необходимость иметь строго селективный ингибитор, реагирующий с белком количественно. Убедиться в этом можно, только получив предварительно белок в чистом виде и исследовав реакцию модификации. Такие необратимые ингибиторы описаны в гл.5. Предложено также использовать некоторые прочно связывающиеся обратимые ингибиторы, например *n*-аминобензамидин для титрования трипсина и тромбина [1682].

Если указанные выше условия выполняются и известно число активных центров в молекуле фермента, то определить абсолютную концентрацию фермента можно, не прибегая к меченым ингибиторам и выделению модифицированного белка. Используя концентрации ингибитора заведомо меньшие, чем концентрация фермента, и определяя остаточную активность фермента, можно найти искомое значение его концентрации (рис.46).

Другой способ титрования активных центров, применяемый в тех случаях, когда реакция идет ступенчато с накоплением промежуточного соединения, зак-

Рис.46. Титрование активного центра фермента
Зависимость активности (A) от молярного соотношения ингибитора и фермента

лучается в измерении первоначального "выброса" продукта на предстационарной стадии [1208,1683]. Представим себе, что реакция фермента с субстратом приводит к быстрому образованию первого продукта (P_1) и медленному распаду промежуточного комплекса (ES') с образованием второго продукта (P_2):



Кривая накопления продукта P_1 во времени будет при этом выглядеть так, как показано на рис.47. Экстраполируя прямую, соответствующую стационарной стадии процесса к нулевому времени, можно получить величину "выброса" (π), связанную с константами скоростей соотношением:

$$\pi = [E]_0 k_1' / (k_1' + k_2)^2; \quad (19)$$

если $k_1' \gg k_2$, то $\pi = [E]_0$.

Удачными субстратами для титрования активных центров сериновых протеиназ являются *транс*-циннамоилимидазол, *n*-нитрофенилацетат [1208], нитрофениловые эфиры *N*-защищенных аминокислот [1684], а также аминокислотные производные родамина [1685,1686]. Последние позволяют титровать фемтомольные концентрации ферментов. Предложен интересный титрант сериновых протеаз на основе бычьего панкреатического трипсинавого ингибитора (БПТИ), в котором остаток лизина активного центра заменен на нитроанилиды различных аминокислот. Отщепление нитроанилина приводит к регенерации ингибиторных свойств БПТИ и реакция с ферментом имеет стехиометрический характер [1687].

Наиболее общим методом определения абсолютной концентрации фермента является измерение скорости гидролиза субстратов в условиях $[E]_0 \approx [S]_0$ [1659, с. 114].

В соответствии с уравнением

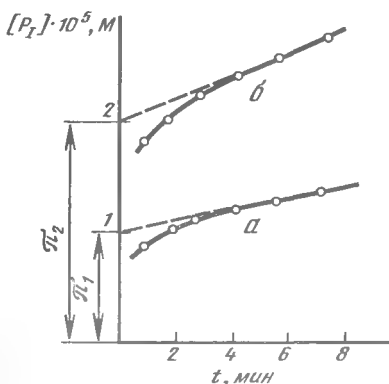
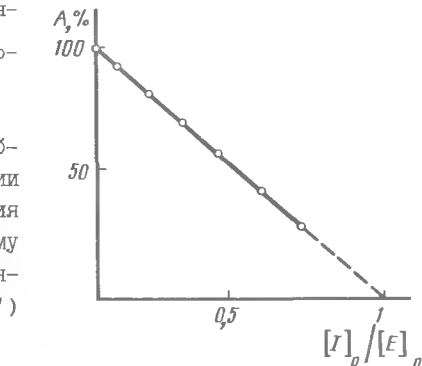


Рис.47. Кинетика образования *n*-нитрофенола в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата, катализируемой α -химотрипсином для двух концентраций фермента (a и $б$)

$$\frac{1}{1+\lambda} = \frac{[S]_0}{\lambda_0[E]} - \frac{K_m}{[E]_0}, \quad (19a)$$

где $\lambda = 1/(V_{\max}/v - 1)$, график в координатах $1/(1+\lambda)$ от $[S]_0/\lambda$ имеет наклон, равный $1/[E]_0$.

В тех случаях, когда определить абсолютную концентрацию активных центров по каким-либо причинам не удастся, ограничиваются измерением активности фермента, выражая ее как количество фермента, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин. Предложено большое число субстратов и способов, в том числе автоматических [1688], позволяющих определить очень низкие концентрации амидгидролаз [1689–1714]. Некоторые из используемых для этой цели субстратов перечислены в табл.33.

Таблица 33. Некоторые субстраты, используемые для чувствительного определения активности амидгидролаз

Субстрат	Фермент	Метод	Чувствительность, нг	Литературный источник
Сукцинилальбумин + флуорескамин	Пепсин	Ф	1	[1694]
^{125}I -гемоглобин (тв)	Трипсин	Р	0,2	[1700]
^{14}C -эластин (тв)	Эластаза	Р	1	[1700]
КМ-лизоцим (цитохром С)	Трипсин Химотрипсин	Х	2,5–10	[1706]
Казеин- β -глюкозидаза (тв)	Трипсин Химотрипсин	Фр	0,3 0,3	[1701] [1701]
	Плазмин		30	[1701]
	Бромелаин		30	[1701]
Овомукоид + трипсиноген	Энтеропептидаза	Х	2	[1714]
LeuNH_2 -лейциндегидрогеназа	Лейцинаминопептидаза	Фр	—	[1702]
^3H -BzPhe-Ala-ArgOH	Карбоксипептидаза Н Карбоксипептидаза В	Р Р	0,01	[1713] [1689]
Gln-His-Phe _N -Phe-Ala-LeuNH ₂	Пепсин Катепсин Катепсин D	Сп	100	[1703]
ZPheOMC	Химотрипсин	Ф	2	[1705]
N-пептидил-AMC	Фактор коагуляции Тромбин Калликреин Урокиназа и др.	Ф	5–50	[1693, 1695, 1711]
7-(GltPheNH-)4MCL	Химотрипсин	Ф	10	[1708]
AntLys-p-NA*	Трипсин	Ф	25	[1709]
Dns-D-Ala-Gly-Phe _N -Gly*	Энкефалиназа	Ф	—	[1704]
ZLysSBzl	Калликреин Плазмин и др. и др.	S	≈4	[1697]

Таблица 33 (окончание)

Субстрат	Фермент	Метод	Чувствительность, нг	Литературный источник
H ₂ Phe-Phe _T OH	Лейциламинопептидаза	S	10-300	[1707]

Сокращения: тв - твердофазный метод; Phe_N - *п*-нитрофенилаланин; ОМС - 7-окси-4-метилкумарил; АМС - 7-амино-4-метилкумарил; МСЛ - 7-амино-4-метилхинолонил; АА - 2-аминоакридонил; Ant - антроноил-(О-аминобензоил); *p*-NA - *п*-нитроанилид; SBzl - тиобензиловый эфир; Phe_T - 3-тиафенилфенилаланин;

Ф - флуоресцентный; Р - измерение радиоактивности; Х - хроматографический; Фр - ферментативный; Сп - спектрофотометрический; S - определение SH-группы.

* Основан на внутримолекулярном тушении флуоресценции в субстрате.

4.1.3. Смысл и значение кинетических констант

Из экспериментов по стационарной кинетике реакции гидролиза субстратов и значений молярной концентрации активных центров фермента можно получить кинетические константы k_{cat} и K'_m , а также их отношение.

Лишь в простейшем случае кинетической схемы (2) смысл величин k_{cat} и K'_m является однозначным - k_{cat} равна k_2 , т.е. константе скорости первого порядка превращения фермент-субстратного комплекса в продукты реакции, а K'_m равна K_s - константе диссоциации фермент-субстратного комплекса, причем последнее справедливо лишь при условии $k_{-1} \gg k_2$.

Значительно сложнее обстоит дело, если на пути от субстрата к продуктам образуется несколько фермент-субстратных комплексов. Так, для схемы (5) значения кинетических параметров будут:

$$k_{cat} = \frac{k_3 K_P}{1 + K_P} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3}, \quad (20)$$

$$K'_m = \frac{K_m}{1 + K_P} = \frac{(k_{-1} + k_3)(k_{-2} + k_3)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_3)}, \quad (21)$$

$$\frac{k_{cat}}{K'_m} = \frac{k_3 K_P}{K_m} = \frac{k_1 k_2 k_3}{(k_{-1} + k_3)(k_{-2} + k_3)}. \quad (22)$$

Таким образом, ни одна из экспериментально определяемых констант в общем случае не отражает ни прочности фермент-субстратных комплексов, ни скорости их превращений.

В зависимости от соотношения величин констант скоростей индивидуальных стадий экспериментально определяемые кинетические параметры могут принимать значения, приведенные в табл.34 (при условии $k_{-1} \gg k_3$).

Для схемы (7) имеем:

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}, \quad K'_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{и} \quad \frac{k_{\text{cat}}}{K'_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}.$$

Таблица 34. Значения наблюдаемых кинетических параметров при различном соотношении констант скоростей индивидуальных стадий для кинетической схемы (5) [1715]

Вариант	K_P	k_3	k_{cat}	K'_m	k_{cat}/K'_m
1	«1	« k_{-2}	$k_3 k_2 / k_{-2}$	K_s	$k_3 k_2 / K_s k_{-2}$
2	«1	» k_{-2}	k_{-2}	K_s	k_{-2} / K_s
3	»1	« k_{-2}	k_3	$K_s k_{-2} / k_2$	$k_3 k_2 / K_s k_{-2}$
4	»1	» k_{-2}	k_3	$K_s k_3 / k_2$	k_2 / K_s

Если наиболее медленной стадией является образование комплекса EA, т.е. $k_{-1} \gg k_2$ и $k_3 \gg k_2$, то $k_{\text{cat}} = k_2$ и $K'_m = k_{-1}/k_1 = K_s$, если же лимитирующей стадией является распад EA, т.е. $k_{-1} \gg k_2$, но $k_3 \ll k_2$, то $k_{\text{cat}} = k_3$, а $K'_m = K_s k_3 / k_2$. Независимо от лимитирующей стадии отношение $k_{\text{cat}}/K'_m = k_2/K_s$.

Приведенные соображения показывают, что наблюдаемые на опыте константы могут в зависимости от лимитирующей скорости всего процесса стадии отражать различные типы фермент-субстратного взаимодействия. По мнению Клиланда [1716], очень часто скорость ферментативного процесса лимитируется или скоростью изомеризации промежуточных комплексов, или скоростью диссоциации продуктов.

4.1.4. Непродуктивное связывание

Субстрат может связываться с ферментом таким образом, что образовавшийся комплекс окажется неактивным, т.е. неспособным превращаться в продукты реакции. Такой комплекс называют [1717, 1718] непродуктивным, и его образование наряду с продуктивным комплексом приводит к изменению наблюдаемых кинетических параметров гидролиза. Действительно, для кинетической схемы



уравнение скорости образования продукта будет:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s + (1 + K_s/K'_s) [S]_0}. \quad (24)$$

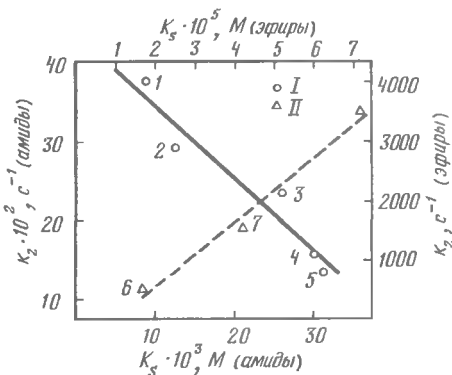
Отсюда следует, что величины экспериментально определяемых кинетических констант будут:

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2}{1 + K_s/K'_s} \quad \text{и} \quad K'_m = \frac{K_s}{1 + K_s/K'_s}. \quad (25), (26)$$

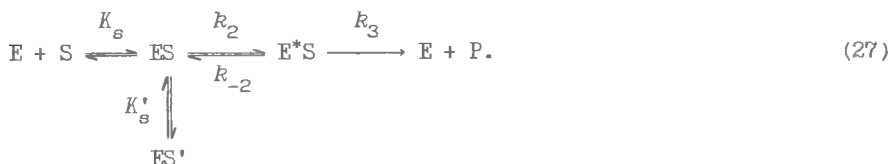
Таким образом, обе константы будут уменьшаться на одинаковую величину, и это изменение будет проявляться тем сильнее, чем больше соотношение констант K_s/K'_s . Очевидно, что величина k_{cat}/K'_m не изменяется при непродуктивном связывании и остается равной k_2/K_s . Характерным признаком непродуктивного связывания в серии однотипных субстратов является симбатное изменение k_{cat} и K'_m при постоянном их отношении. В качестве примера можно привести данные по кинетике гидролиза сложных эфиров и амидов α -химотрипсина (рис.48). В отличие от амидов в ряду эфиров наблюдается непродуктивное связывание [1719].

Рис.48. Зависимость k_2 от K_s в ряду амидных (I) и эфирных (II) субстратов α -химотрипсина [1719]

1- 4-PuTyrNH_2 ; 2- 3-PuTyrNH_2 ;
3- $\text{ClCH}_2\text{COTyrNH}_2$; 4- $\text{CF}_3\text{COTyrNH}_2$;
5- $\text{CH}_3\text{TyrNH}_2$; 6- CinnTyrOEt ;
7- AcLeuTyrOMe ; 8- BzTyrOMe
(Pu - пиридинил, Cinn - циннамоил)



В кинетической схеме с несколькими промежуточными фермент-субстратными комплексами (см. схему 5, разд.4.1.1) может реализоваться несколько иной тип непродуктивного связывания, а именно изомеризация первого комплекса в непродуктивный (ES'):

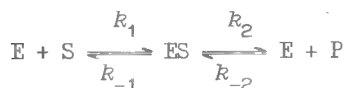


В этом случае наблюдаемые кинетические параметры будут [1715]

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_3 K_P}{K_P + (1 + K'_s)} \quad \text{и} \quad K'_m = \frac{K_s}{K_P + (1 + K'_s)},$$

где $K_P = \frac{k_2}{k_{-2} + k_3}$ и $K'_s = [ES']/[ES]$.

Как и в первом случае, непродуктивное связывание здесь не влияет на отношение кинетических констант. Наконец, для обратимых реакций



В УСЛОВИЯХ, КОГДА $K_2 \ll k_{-1}$, значение K_m в направлении образования субстрата равно $K_{m,P} = k_{-1}/K_2$, т.е. вообще никакого отношения к связыванию продукта не имеет (так называемая кинетическая константа Ван-Слайка) [1720].

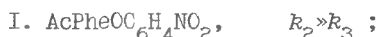
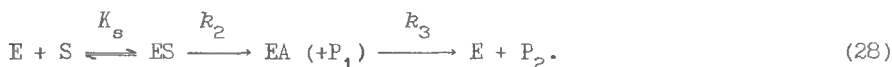
4.1.5. Определение индивидуальных кинетических констант

Как показывают изложенные выше данные, анализ кинетики ферментативного гидролиза на основе величин k_{cat} и K_m может дать лишь ограниченную информацию о скоростях отдельных стадий и устойчивости промежуточных комплексов. Поэтому большое значение приобретает определение постадийных констант скорости и равновесия. С этой целью применяются как методы стационарной кинетики, так и методы исследования процесса на предстационарной стадии.

4.1.5.1. Стационарные методы

Здесь мы остановимся на трех методах, применяемых при исследовании гидролитических реакций.

Первый из них заключается в том, что подбирают два (или больше) субстрата так, чтобы стадии, лимитирующие скорость, для них были различны, но константы скорости одной из стадий одинаковы. Например, если взять в качестве субстратов α -химотрипсина n -нитрофениловый эфир и амид N -ацетил- L -фенилаланина, то в первом случае лимитирующей стадией будет распад промежуточного ацилфермента, а во втором – его образование [1721]:



Поскольку оба субстрата имеют одинаковую ацильную группу и отличаются только характером отщепляемого продукта P_1 , то значения k_3 для них должны быть одинаковыми. Поэтому, чтобы определить k_3 для субстрата II, достаточно получить $k_{cat} = k_3$ для субстрата I. Для всех соединений – производных ацетил- L -фенилаланина величину k_2 можно найти из соотношения:

$$k_2 = \frac{k_3 k_{cat}}{k_3 - k_{cat}}.$$

Аналогично можно найти $K_m = K_m'(k_2 + k_3)/k_3$. Этот метод, однако, имеет ограниченное применение, так как могут возникнуть осложнения из-за непродуктивного связывания и, кроме того, при близких значениях k_3 и k_{cat} он дает очень большую ошибку.

Второй метод заключается в использовании фактора, влияющего только на одну стадию процесса. Пусть, например, имеется вещество, введение которого в систему влияет только на величину k_2 (см. схему 28). В присутствии этого вещества кинетика гидролиза описывается уравнением:

$$v^* = \frac{\frac{k_2^* k_3}{k_2^* + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_s \frac{k_3}{k_2^* + k_3} + [S]_0}. \quad (29)$$

Решая совместно уравнения (8) (в предположении, что $k_2 \ll k_{-1}$) и (29), мож-

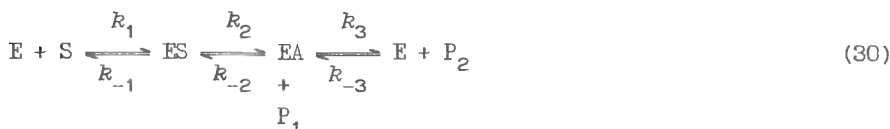
Рис.49. Определение индивидуальных кинетических констант с помощью введенного нуклеофила [1723] Гидролиз этилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (25°C; 0,1 н. KCl; $[E]_0 = 1,03 \cdot 10^{-8}$ М) в отсутствии и присутствии 0,11 М и 0,22 М 1,4-бутандиола

но показать, что в координатах $1/v + 1/[S]_0$ две прямые (соответствующие v и v^*) будут пересекаться в точке с координатами $1/[S]_0 = -1/K_s$ и $1/v = -1/k_3[E]_0$ (рис.49). Отсюда, зная K_s и k_3 , легко найти k_2 [1722-1724].

В качестве эффекторов α -химотрипсина были предложены борная кислота, ионы меди, спирты и др. [1722, 1723, 1725, 1726].

Наконец, третий метод (метод Бойера [1727]) заключается в исследовании скорости включения в субстрат меченных изотопами продуктов реакции в условиях термодинамического равновесия системы.

Для схемы



равновесие может быть достигнуто введением продуктов P_1 и P_2 в концентрациях, удовлетворяющих условию

$$K_{eq} = [P_1][P_2]/[S].$$

Если P_1 и P_2 содержат радиоактивную метку, то эта метка будет включаться в субстрат (S). Измеряя скорость появления метки в субстрате в зависимости от различных равновесных концентраций P_1 и S или P_2 и S, получают кривые типа показанной на рис.50. Скорости включения P_1 и P_2 (соответственно R' и R) даются уравнениями [1727, 1728]

$$R = \frac{[E]_0}{\left(\frac{1}{k_{-1}} + \frac{k_3 + k_{-2}[P_1]}{k_2 k_3}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[S]} + \frac{K_2}{[P_1]}\right)}, \quad (31)$$

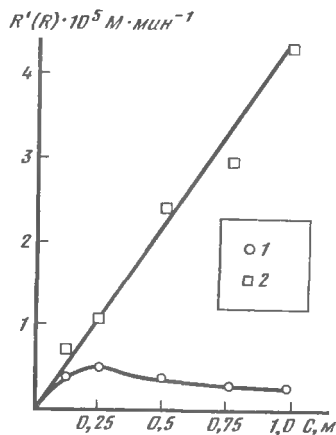


Рис.50. Зависимость скорости включения N-ацетил-L-фенилаланина (1) и глицидинамида (2) в N-ацетил-L-фенилаланилглицинамид от концентрации глицидинамида (рН 8,2; время инкубации 30 мин; $[E]_0 = 16 \cdot 10^{-4}$ М) [1729]

$$R' = \frac{[E]_0}{\left(\frac{1}{k_{-1}} + \frac{1}{k_2}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[S]} + \frac{K_2}{[P_1]}\right)}, \quad (32)$$

где $K_1 = K_s$ и $K_2 = k_{-2}/k_{-1}$. В пределе при $[S] \gg K_1$ и $[P_1] \gg K_2$ и при условии, что $k_{-1} \gg k_2$, получим $R' = k_2[E]_0$. Зная k_2 , можно найти k_3 и K_s , а из зависимости

$$\frac{R'}{R} = 1 + \frac{k_{-2}}{k_3} [P_1] \quad (33)$$

найти k_{-2} . Наконец, k_{-3} можно вычислить из соотношения Холдена (см. разд. 4.2):

$$K_{eq} = \frac{k_2 k_3}{K_s k_{-2} k_{-3}}.$$

Этим методом были получены все индивидуальные константы гидролиза N-ацетилфенилаланилглицинамида химотрипсином [1729-1731], а также исследован гидролиз некоторых пептидов пепсином [1732].

4.1.5.2. Методы предстационарной кинетики

Эти методы описаны в многочисленных руководствах [1733-1736], и здесь мы рассмотрим лишь один пример. Пусть необходимо определить индивидуальные константы гидролиза *n*-нитрофенилового эфира ациламинокислоты, катализируемого химотрипсином. Реакция идет по схеме (7). Для этого необходимо измерить скорость образования нитрофенола на предстационарной стадии, что можно сделать с помощью аппарата остановленного потока, в котором реагенты смешиваются и изменение оптической плотности регистрируется в течение нескольких миллисекунд. Если эти опыты провести в условиях $[E]_0 \gg [S]_0$ при разных начальных концентрациях фермента, то можно получить зависимость изменения концентрации продукта от времени для разных значений $[E]_0$. Эти величины связаны выражением:

$$[P_1] = [S]_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} t\right) \right] \quad (34)$$

Таким образом, эффективная константа скорости процесса

$$k' = \frac{k_2 [E]_0}{K_s + [E]_0} \quad \text{или} \quad \frac{1}{k'} = \frac{K_s}{k_2} \frac{1}{[E]_0} + \frac{1}{k_2}. \quad (35), (36)$$

Строя зависимость $1/k'$ [вычисленное из уравнения (34)] от $1/[E]_0$, получим прямую с наклоном K_s/k_2 и отсечением на оси ординат $1/k_2$.

Наряду с методом остановленного потока широко используются релаксационные методы - температурного и pH-скачка, ультразвуковой релаксации и др.

4.1.6. Отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен

Отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен в реакциях, катализируемых амидгидролазами, возникают обычно в следующих случаях: 1) когда субстрат выступает одновременно в роли эффектора (ингибитора или активатора); 2) когда имеет место кооперативное связывание субстрата субъединицами фермента; 3) когда молекулы фермента взаимодействуют друг с другом, изменяя при взаимодействии сродство к субстрату [1737].

Случаи ингибирования и активации субстратом описываются кинетической схемой:



Соответствующее выражение для скорости образования продукта P будет [1659]:

$$v = \frac{\beta k_2 [S]_0}{(k_2 + \frac{\beta k_2 [S]_0}{K'_s}) [E]_0 [S]_0} \cdot \frac{[S]_0^2}{K_s + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K'_s}}. \quad (38)$$

Рис.51. Активация и ингибирование субстратом. График в координатах Лайнуивера-Берка для гидролиза N-карбобензоксипептидазы А (25°C; pH 7,5; $[E]_0 = 5,4 \cdot 10^{-9}$ М) [1738]

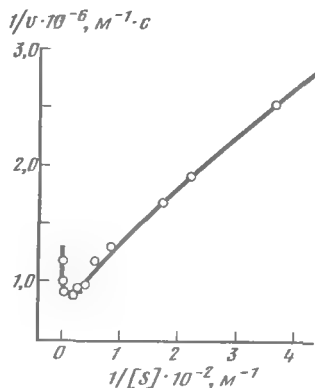
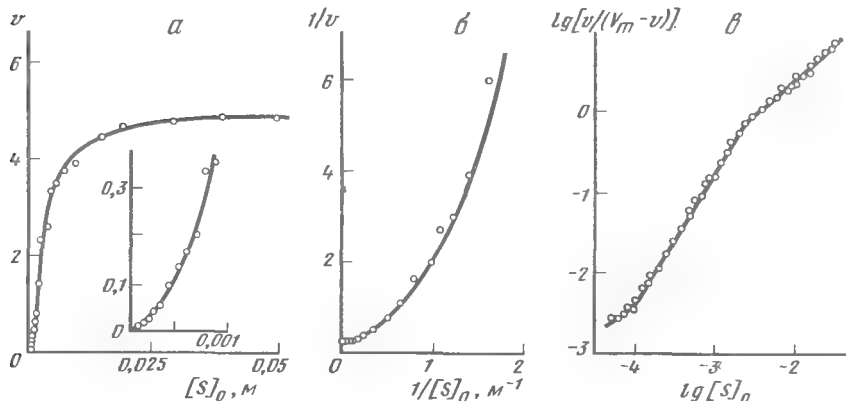


Рис.52. Кинетические зависимости для аллостерических ферментов в прямых (а), двойных обратных (б) и логарифмических (в) координатах [1737]



Типичный график зависимости $1/v$ от $1/[S]_0$ для случая ингибирования и активации субстратом представлен на рис.51 [1738].

При больших концентрациях субстрата (левая ветвь графика) уравнение (38) можно преобразовать к виду (так как $K_s \ll [S]_0$):

$$k' = \frac{v}{[E]_0} = k_2 \frac{1 + \frac{\beta[S]_0}{K'_s}}{1 + \frac{K'_s}{[S]_0}} \quad (39)$$

или

$$\frac{1}{1-k'/k_2} = \frac{1}{1-\beta} + \frac{K'_s}{1-\beta} \frac{1}{[S]_0}. \quad (40)$$

Зависимость $1/(1-k'/k_2)$ от $1/[S]_0$ будет иметь вид прямой, из наклона которой и пересечений с осями можно найти значения β и K'_s .

Хотя среди амидгидролаз очень немного ферментов, проявляющих кооперативность при связывании субстрата, все же такие случаи имеются, и поэтому необходимо описать простейшие способы их анализа (см. обзор: [1737]). Кооперативное связывание предполагает наличие в молекуле фермента нескольких центров связывания субстрата, причем связывание в одном из них или увеличивает сродство другого центра к субстрату (положительная кооперативность), или снижает его (отрицательная кооперативность). Ферменты, проявляющие такие свойства, называются аллостерическими. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в случае положительной кооперативности представляет собой сигмоиду (рис.52,а,б). Анализ кинетики аллостерических ферментов проводят по уравнению Хилла [1739]:

$$\lg \frac{v}{V_{\max} - v} = n(\lg[S]_0 - \lg[S]_{0.5}),$$

где $[S]_{0.5}$ — концентрация субстрата, при которой $v = V_{\max}/2$; n — коэффициент Хилла, показывающий степень кооперативности связывания. При $n=1$ кооперативность отсутствует, при $n>1$ наблюдается положительная кооперативность, а при $n<1$ — отрицательная.

Уравнение Хилла выполняется в относительно узком интервале концентраций субстрата и коэффициент n можно определить в этом интервале из графика зависимости $\lg(V_{\max} - v)$ от $\lg[S]_0$ (рис.52,б) как наклон кривой в точке полунасыщения [т.е. в точке $\lg(V_{\max} - v)=0$]. Предложены также и другие методы определения коэффициента Хилла для тех случаев, когда $V_{\max}$ неизвестно [1740, 1741]. В случае димерного фермента возможна ситуация, когда связывание субстрата одной субъединицей дестабилизирует комплекс другой субъединицы. При этом возникает так называемая полуцентровая реактивность [1742].

Отклонения от гиперболической зависимости скорости от концентрации субстрата могут возникать при олигомеризации фермента, что сопровождается изменением активности вследствие маскирования части активных центров. В простейшем случае, когда образуются линейные ассоциаты так, что стерически экранируются все активные центры за исключением расположенного на конце оли-

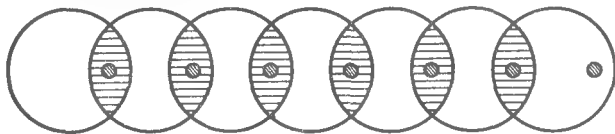


Рис.53. Схема олигомеризации фермента с экранированием активных центров

гомерной цепи (рис.53), активность ассоциата будет связана с концентрацией фермента соотношением:

$$a = \frac{2a_1}{1 + \sqrt{1 + 4K[E]_0}}$$

где a – удельная активность ассоциата; a_1 – удельная активность мономера; K – константа ассоциации мономер – N -мер (предполагается равенство констант ассоциации на каждой стадии) [1743].

4.2. Связь скоростей и равновесий

Как и всякий катализатор, фермент не изменяет положения равновесия химической реакции. Однако для ферментативных реакций имеется одно обстоятельство, на которое следует обратить внимание. Ферментативный катализ, как правило, – многостадийный процесс, поэтому константа равновесия такого процесса – сложная величина, которую можно представить через константы равновесия отдельных стадий ("микроскопические" константы, K_i):



$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \prod_{i=1}^t K_i.$$

Поскольку для любой стадии $K_i = k_{-i}/k_i$, то выражение (41) можно написать в виде:

$$K_{eq} = \frac{\prod_{i=1}^{t-1} k_{-i}}{\prod_{i=1}^t k_i}. \quad (42)$$

Это соотношение известно как уравнение Холдена [1744], связывающее константы скоростей с термодинамической константой равновесия реакции. Уравнение (42) можно записать через изменение свободных энергий:

$$\Delta G_o = \sum_{i=1}^{t-1} \Delta G_{-i}^\ddagger - \sum_{i=1}^t \Delta G_i^\ddagger, \quad (43)$$

где ΔG_o – изменение стандартной свободной энергии реакции; $\Delta G_{-i}^\ddagger$ – свободные энергии активации каждой стадии в обратной реакции; $\Delta G_i^\ddagger$ – то же для прямой реакции.

Соотношение Холдена показывает, что реакции в прямом и обратном направлении протекают через одни и те же переходные состояния, т.е. что пути прямой и обратной реакции в точности противоположны. Этот принцип называется

принципом детального равновесия, или принципом микроскопической обратимости, и имеет важное значение для понимания механизмов реакций.

4.3. Специфичность

Ферментативный катализ характеризуется высокой чувствительностью к структуре субстрата и к условиям, в которых проводится каталитическая реакция. При анализе *субстратной специфичности* амидгидролаз необходимо различать несколько уровней:



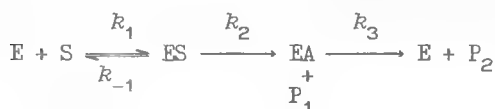
Субстратная специфичность протеаз (как и других деполимераз) может проявляться на уровне остатка аминокислоты, образующей своей амино- или карбоксигруппой расщепляемую связь (остатки R_1 и R_1' в соответствии с принятой номенклатурой [1745]) – так называемая *первичная специфичность*. Часто заметное влияние на способность субстратов гидролизываться в присутствии протеаз оказывают остатки, удаленные от расщепляемой связи, т.е. *вторичная специфичность*.

В случае белков или больших олигопептидов общая пространственная организация молекулы может быть важным фактором, определяющим положение расщепляемой связи. Это так называемая *третичная специфичность*. Наконец, иногда проявляется зависимость катализа от олигомерной структуры гидролизываемого белка – *четвертичная специфичность*.

Далее в соответствии с классификацией протеаз можно выделить уровни *позиционной специфичности* – способности фермента катализировать гидролиз лишь N- или C-концевых аминокислотных остатков (экзопептидазы) или остатков, расположенных внутри полипептидной цепи (эндопептидазы).

Еще один уровень субстратной специфичности – это *стереоспецифичность*, т.е. чувствительность амидгидролаз к конфигурации асимметрических атомов в молекуле субстрата.

При количественном анализе субстратной специфичности ферментов возникает проблема выбора наилучшего критерия для такого анализа. Поскольку ферментативные реакции многостадийны, необходимо выбирать в качестве меры специфичности параметр, характеризующий определенную стадию или совокупность стадий процесса. Так, для трехстадийной схемы



можно говорить о специфичности на стадии комплексообразования ($\bar{K}_s = k_1/k_{-1}$), ацилирования фермента (k_2) или его деацилирования (k_3). Однако при этом возникают определенные трудности, связанные с тем, что экспериментально определяемые константы равновесия или скорости могут быть эффективными величинами, включающими, например, константу диссоциации непродуктивного комплекса. Поэтому во многих случаях предпочитают пользоваться для характеристики специфичности константой скорости второго порядка (k_{cat}/K_m), которая не зависит от степени непродуктивного связывания субстрата. Эта величина также может включать несколько кинетических параметров, если процесс идет через образование нескольких промежуточных комплексов.

Таким образом, анализ специфичности необходимо проводить, используя максимально возможную информацию о скоростях реакции на каждой стадии процесса.

Еще большие трудности возникают при сравнении специфичности разных ферментов. В этом случае относительная скорость гидролиза субстрата, катализируемого двумя ферментами, зависит от выбора субстрата. Для одного субстрата эти скорости могут быть одинаковыми, а для другого, даже сходного по строению, — совершенно разными.

В этой связи мне представляется наилучшим определение специфичности как способности фермента изменять свою каталитическую активность при изменении структуры субстрата. В соответствии с этим определением, если мы располагаем какой-либо количественной характеристикой структуры субстрата (Z_s), специфичность фермента можно было бы характеризовать графиком типа представленного на рис. 54. При этом мерой специфичности является наклон графика, построенного для большого числа субстратов, различающихся структурным параметром Z_s (или суммарным параметром такого типа). Конечно, и в этом случае выбор субстратов имеет важное значение. Если, например, для анализа специфичности экзопептидазы взять серию защищенных дипептидов, то по отношению к этим субстратам экзопептидаза, по-видимому, не проявляет какой-либо специфичности.

Возможности такого подхода будут продемонстрированы ниже. Рассмотрим экспериментальные результаты анализа специфичности амидгидролаз.

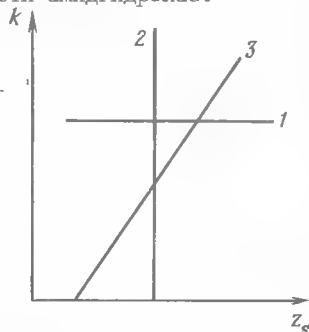


Рис. 54. Зависимости константы скорости ферментативной реакции (k) от структурного параметра субстрата (Z_s)

1 — отсутствие специфичности; 2 — абсолютная специфичность; 3 — промежуточный случай

4.3.1. Общая характеристика

Число работ по специфичности амидгидролаз огромно и не поддается сколько-нибудь исчерпывающему анализу. Многие ранние данные можно найти в обзорах: [178–180, 1746–1748]. Появляются также обзоры, посвященные отдельным ферментам или группам ферментов: [181–183, 185–187, 1749–1752]. Ниже будут приведены данные, характеризующие специфичность амидгидролаз на различных уровнях ее проявления.

Таблица 36. Сравнение эстеразной и амидазной активности некоторых амидгидролаз

Фермент	Субстрат	k_{cat} , с ⁻¹	$K_m \cdot 10^3$ М	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹	$\frac{k_{cat}/K_m \text{ (эфир)}}{k_{cat}/K_m \text{ (амид)}}$	Литературный источник
α -Химотрипсин	AcPheOMe AcPheNH ₂	57,5 0,039	1,5 37,0	0,38·10 ⁵ 1,05	3,6·10 ⁴	[1761]
Трипсин	BzLysOMe BzLysNH ₂	12,9 0,32	0,028 4,25	4,6·10 ⁵ 75,3	0,61·10 ⁴	[1762]
Эластаза	AcAla ₂ AlaOMe AcAla ₂ Pro-AlaNH ₂	120 6,1	0,067 2,1	17,9·10 ⁵ 2,9·10 ³	617	[1763, 1764]
Субтилизин	AcAla ₃ OMe AcAla ₃ pNA	2300 0,023	1,6 0,03	1,44·10 ⁶ 766	1,9·10 ³	[1765]
Папаин	BzArgOEt BzArgpNA	16,1 0,74	13 2,86	1,24·10 ³ 258,7	4,8	[1766]
Карбокси-пептидаза Y	AcPheOEt AcPheNH ₂	120 5,3	1,2 10	1·10 ⁵ 530	189	[250]
Пепсин	ZHisPhe(NO ₂)-PlaOMe ZHisPhe(NO ₂)-PheOMe	0,13 0,07	0,4 0,52	325 135	2,4	[1767]
Карбокси-пептидаза A	BzGly-Gly-PleOH BzGly-Gly-PheOH	500 20	0,33 1,0	1,5·10 ⁶ 2·10 ⁴	75	[1768]
Лейциламинопептидаза (хрусталик глаза быка)	LeuOEt LeuNH ₂	25 2·10 ⁴	500 28	50 7·10 ⁵	7·10 ⁻⁵	[954]
Дипептидилкарбоксипептидаза	BzPhe-Ple-Ala BzPhe-Phe-Ala	18,3 90	0,065 0,065	2,8·10 ⁵ 13,8·10 ⁵	0,2	[1769]
Амидаза <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CH ₃ COOEt CH ₃ CONH ₂	<1 162	660 0,83	<1,5 1,9·10 ⁵	<1·10 ⁻⁵	[1770, 1771]
Пенициллинамидаза	C ₆ H ₅ CH ₂ COOEt C ₆ H ₅ CH ₂ CONHCH ₂ COOEt	170 47	0,045 0,08	3,7·10 ⁶ 0,6·10 ⁶	6,3	[1772]

или с малой боковой цепью (тип эластазы), способных гидролизовать амидные связи рядом с остатком пролина (пролидазы) и т.д.

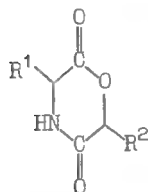
Более подробные сведения о специфичности получают из данных кинетических исследований гидролиза большого числа синтетических и природных субстратов.

4.3.1.1. Типы расщепляемых связей

Амидгидролазы практически всех типов способны катализировать гидролиз не только обычных пептидных связей, но и связей других типов – сложэфирных, тиоэфирных, анилидных и др. Наиболее подробно изучен гидролиз сложных эфиров различными протеазами и амидгидролазами. Соотношение между эстеразной и

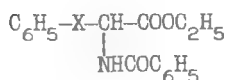
амидазной активностями сильно варьирует у разных ферментов (табл.36) – у некоторых сериновых протеаз оно достигает четырех порядков. У цистеиновых и аспартатных протеаз эстеразная активность лишь в несколько раз выше, чем амидазная, тогда как у amino- и карбоксипептидаз амидазная активность может превышать эстеразную. Многие амидгидролазы вообще не обладают эстеразной активностью (см., например: [585,1773]). Эстеразная и амидазная активности могут быть обусловлены разным типом связывания и, возможно, разными каталитическими группами фермента. Такое положение, по-видимому, существует у сериновых карбоксипептидаз (карбоксипептидаз W и Y), оба типа активности у которых контролируются группами с разными значениями pK_a [1774].

Химотрипсин и трипсин расщепляют также лактонные связи в дикетоморфолинах – производных специфических amino- и оксикислот [1775–1777]:

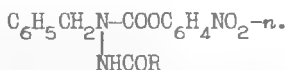


Скорость гидролиза таких соединений почти не уступает скорости гидролиза обычных эфиров этими ферментами.

Следует отметить, что ни дикетопиперазины [1778], ни циклопептиды с числом аминокислот, меньшим 6 [1779–1781] не расщепляются химотрипсином или трипсином. Описаны еще два типа сложноэфирных субстратов химотрипсина. Это α -замещенные ациламинокислоты (I) [1782] и производные ацилкарбазатов (II) [1783,1784]:

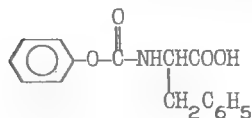


I



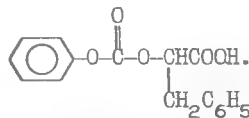
II

Карбоксипептидаза A эффективно расщепляет карбаматные и карбонатные связи в производных фенилаланина:



III

и



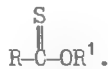
IV

Соотношение констант скорости второго порядка (IV):(III)=82 [1785].

Многие протеазы расщепляют тиозфирные (V) и тионовые связи (VI) [1786–1788]:



V



VI

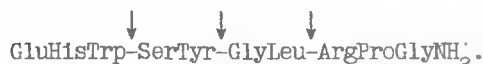
Однако тиюсопептиды являются ингибиторами лейцинаминопептидазы [1789].

n-Нитрофенилтисоацетат гидролизуетс^я химотрипсином практически с той же скоростью, что и *n*-нитрофенилацетат [1787], однако для гидролиза этиловых эфиров наблюдается более высокая реакционная способность тиюсэфиров по сравнению с кислородными эфирами [1790-1793].

Из других типов связей, расщепляемых сериновыми протеазами, следует упомянуть гидразиды, гидроксаматы [1794] и широко используемые для тестирования многих протеаз *n*-нитроанилиды.

4.3.1.2. Позиционная специфичность

Позиционная специфичность амидгидролаз ясна из номера их классификации и не нуждается в специальном рассмотрении за исключением тех случаев, когда фермент проявляет двойственную специфичность или когда новые данные заставляют пересмотреть принятую классификацию. Так, оказалось, что катепсин В проявляет не только эндопептидазную активность, но и функционирует как дипептидилкарбоксипептидаза [763,1795-1797]. Другая цистеиновая протеиназа - катепсин Н функционирует преимущественно как аминопептидаза, однако гидролизует *n*-нитроанилид бензоиларгинина [1798]. Еще один пример - действие ангиотензин превращающего фермента на защищенные олигопептиды. Гидролиз релизинг фактора литеинизирующего гормона этим ферментом происходит, как это показано на схеме [1799]:



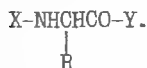
Отмечена способность сериновых карбоксипептидаз проявлять эндопептидазную активность [1800]. Карбоксипептидаза Y, кроме того, катализирует гидролиз изопептидных связей, образованных β -карбоксильной группой аспарагиновой кислоты в некоторых белках [1801].

4.3.1.3. Первичная специфичность

Очень большое число работ посвящено влиянию остатков, соседних с расщепляемой связью, на скорость гидролиза субстратов. Собственно первичная специфичность определяется не только положением данного остатка в цепи полипептида, но и его вкладом в наблюдаемую скорость гидролиза. В некоторых случаях этот вклад имеет решающее значение. Так, трипсин и сходные с ним ферменты расщепляют связи, образованные карбоксильной группой основных аминокислот (Lys, Arg), и этот фактор является наиболее важным для катализа, тогда как в других случаях (например, у пепсина) характер остатков, примыкающих к расщепляемой связи, может иметь меньшее значение, чем характер удаленных от нее остатков. Первичная специфичность паятина определяется остатком в положении P_2 (см. номенклатуру: [1745]) полипептидной цепи [1802]. Однако, чтобы не создавать путаницу в терминологии, здесь мы будем рассматривать первичную специфичность как специфичность к остаткам в положениях P_1 и P'_1 пептида.

В структуре аминокислотного остатка можно различать три важные для специфичности группировки: боковая цепь (R), заместитель при атоме азота (X) и

заместитель при карбонильной группе (Y):



Структурные особенности группы R определяются ее свойствами: липофильностью (гидрофобностью), объемом и зарядом. Группа X может быть атомом водорода или полипептидной цепью, а группа Y – полипептидной цепью, алкокси- или алкил(арил)аминогруппой или гидроксилем. Все эти особенности имеют решающее значение для специфичности.

Очень небольшое число протеаз обладает абсолютной специфичностью к какому-либо конкретному остатку аминокислоты. К таким ферментам относятся, например, 5-оксопролил-пептидаза (3.4.19.3), специфичная к N-концевому пироглутамильному остатку [704,1803], некоторые дипептидазы [1024,1028,1038], пролинспецифичные ферменты [222,1030]. Однако уже эти последние гидролизуют также связи, включающие остатки оксипролина, N-метилаланина, саркозина и аланина [1804,1805].

Большинство протеаз обладает "групповой" первичной специфичностью. Можно различать ферменты, гидролизующие амидные связи, образованные: а) основными остатками аминокислот (Lys, Arg, His), б) объемистыми гидрофобными остатками (Trp, Tyr, Phe, Leu), в) алифатическими неполярными остатками (Gly, Ala, Ser, Gln, Asn), г) остатками, содержащими карбоксильную группу в боковой цепи (Asp, Glu), и д) остатками, содержащими третичный атом азота в основной цепи (Pro, Нур и др.).

По-видимому, наиболее распространены протеазы первой группы – группы трипсина. В нее входят как амино-, так и карбоксипептидазы [682,1064,1806], важные пищеварительные ферменты – сам трипсин и энтеропептидаза [1807], ферменты системы коагуляции крови [313,1808–1813], системы комплемента [558,1814], многочисленные и еще мало исследованные ферменты процессинга [1815,1816]. Среди последних ряд ферментов специфичен к парам основных остатков (расщепляемые связи, образованные такой парой, или связь между такой парой и следующим в направлении к C-концу остатком) [627,632,1817]. У трипсина наблюдается заметная предпочтительность к расщеплению связи Lys-Arg по сравнению со связью Arg-Lys [1818].

Следует отметить, что некоторые ферменты, обладающие специфичностью к основным остаткам в положении P₁, достаточно эффективно расщепляют связи, образованные другими остатками. Это особенно относится к цистеиновым протеиназам папаину [1745,1802,1819,1820], калпаинам I и II [1821,1822] и др.

Вторая группа ферментов включает протеазы с химотрипсиновой специфичностью. Сюда также входят ферменты с разной позиционной специфичностью – аминопептидазы [985,1769,1823], карбоксипептидазы [250,252,1824] и эндопептидазы – химотрипсины из разных источников [1715,1825–1827], мышечные протеиназы [1827–1829], пищеварительные ферменты – пепсин [1749,1750,1830–1833] и гастриксин [1832,1833], микробные протеиназы, например входящие в комплекс "проназа" [369,1834], и др. Эти ферменты, как правило, обладают довольно широкой специфичностью, гидролизуют связи, образованные не только ароматическими, но и различными алифатическими аминокислотными остатками. К этой же группе относятся АТФ-зависимые протеиназы *Escherichia coli* – протеиназы Ia и T1, а также, по-видимому, некоторые мышечные высокомолекулярные проте-

иназы, входящие в состав протеосом [1835-1837]. Протеиназы ретровирусов расщепляют преимущественно связи, образованные карбоксильной группой фенилаланина и тирозина, однако наблюдается также гидролиз связей, содержащих в P_1 -положении остаток метионина [1838, 1839].

Наиболее изученными представителями третьей группы ферментов, гидролизующих связи, образованные карбоксильной группой алифатических остатков с небольшой боковой цепью, являются эластазы [1840-1845] и ферменты, родственные субтилизинам [1765, 1846, 1847]. Эти ферменты наименее специфичны и используются для максимально глубокого расщепления белков (протеиназа К). К этой же группе можно отнести коллагеназы позвоночных. Для этих ферментов характерно наличие в P_1 -положении субстрата остатка глицина, а в P_1' - остатков Leu, Ile, Phe, Val [1848]. В то же время коллагеназы клостридий преимущественно гидролизуют связи с остатком Glu в P_1' -положении и объемистым гидрофобным остатком в P_1 [1849]. Остаток глицина в P_1 -положении характерен также для субстратов дипептидилкарбоксипептидазы (энкефалиназы) [1850] и протеиназы IV из папайи [1851].

Относительно немногочисленна группа ферментов, расщепляющая связи, образованные карбоксилсодержащими аминокислотными остатками. Сюда относятся протеиназа *Staphylococcus aureus* [1852], родственная ей протеиназа *Streptomyces thermovulgaris* [1853], аминокислотная пептидаза А [985] и некоторые другие протеазы. Интересно, что в зависимости от состава буферного раствора эти ферменты могут расщеплять связи с Glu и Asp в P_1 (например, в трис-буфере) или только с Glu (в ацетатном буфере) [1853]. Коллагенолитические протеазы беспозвоночных гидролизуют связь Glu в P_1 .

Наконец, ферменты, расщепляющие связи с остатком пролина могут быть специфичны к Pro в P_1 - и в P_1' -положениях (соответственно пролил- и пролинпептидазы).

Наименее выраженная первичная специфичность наблюдается у так называемых сигнальных пептидаз. Среди расщепляемых связей имеются связи, образованные остатками серина, аланина, глицина, изолейцина, глутамина в P_1 -положении и изолейцина, аспарагина, валина, гистидина и др. в P_1' -положении. По-видимому, для этих ферментов более важна вторичная структура сигнального пептида [1854].

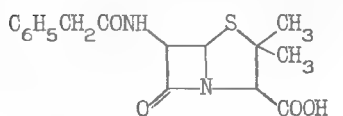
В ряду однотипных ферментов роль аминокислотного остатка в положении P_1 субстрата для проявления специфичности протеазы может быть охарактеризована отношением констант скорости второго порядка при замене одной аминокислоты на другую. Такие данные для ряда сериновых протеиназ типа химотрипсина приведены в табл. 37. Подобное отношение при замене Arg на Lys (в субстратах Tos-Gly-Pro-X-pNA) составляет для тромбина 460, для белка С системы свертывания крови - 48 [1811], а для фактора Ха - 49 [1812].

В случае амидаз разделение по уровням специфичности теряет смысл. Данные по модификации субстратов амидазы из *Pseudomonas aeruginosa* [1771] показывают, что, например, метилирование атома азота резко увеличивает как k_{cat} , так и K_m . Для ацетамида $k_{cat}=162 \text{ с}^{-1}$ и $K_m=0,83 \text{ мм}$, а для N-метилацетамида $k_{cat}=1080 \text{ с}^{-1}$, $K_m=233 \text{ мм}$, что, по-видимому, обусловлено непродуктивным связыванием. Однако в случае пропиламида метилирование приводит как к увеличению K_m (с 7,8 до 248 мм), так и к падению k_{cat} (с 374 до $0,3 \text{ с}^{-1}$).

Таблица 37. Отношение констант скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) для ряда сериновых протеиназ при замене одной аминокислоты (А) на другую (В) в положении P_1
Субстраты BocAlaAla-X-SBzl (по данным [1827])

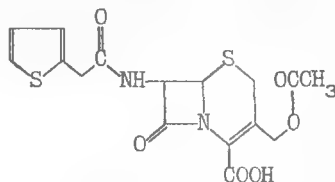
X		$(k_{\text{cat}}/K_m)_A / (k_{\text{cat}}/K_m)_B$					
A	B	Химотрипсин	Лейкоцитарная эластаза	Панкреатическая эластаза	Катепсин G	Химаза I	Химаза II
Leu	Ala	1428	0,3	5,88	—	—	—
Leu	Met	2,56	2,59	1,35	1,1	0,26	0,26
Met	Ala	1057	1,17	2,32	—	—	—

Специфичность β -лактамаз сильно зависит от типа β -лактамных антибиотиков [1856,1857]. Так, β -лактамаза дикого типа *Escherichia coli* гидролизует бензилпенициллин (VII), цефалотин (VIII) и цефалокситин (IX) с константами скорости второго порядка, различающимися более чем в 10^7 раз.



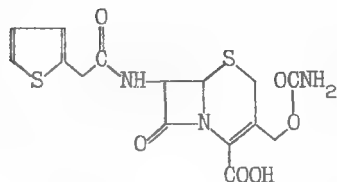
$$k_{\text{cat}} = 2000 \text{ c}^{-1}; K_m = 0,02 \text{ MM}$$

VII



$$k_{\text{cat}} = 120 \text{ c}^{-1}; K_m = 0,2 \text{ MM}$$

VIII



$$k_{\text{cat}} = 0,004 \text{ c}^{-1}; K_m = 0,65 \text{ MM}$$

IX

Следует отметить, что для некоторых ферментов разделение по уровням специфичности лишено смысла из-за того, что они строго специфичны лишь к одному или очень небольшому числу субстратов. Так, почечный ренин гидролизует белок - ангиотензиноген, отщепляя концевой декапептид [923]:



а также гидролизует очень небольшое число синтетических аналогов N-концевой последовательности ангиотензиногена. Другие из исследованных соединений этим ферментом не расщепляются.

4.3.1.4. Вторичная специфичность

Для многих протеолитических ферментов структура аминокислотных остатков субстрата, удаленных от расщепляемой связи, имеет важное значение. Систематические количественные исследования вторичной специфичности были проведены для α -химотрипсина [1825,1858-1861], трипсина [1808,1862-1864], тромбина, плазмина, и других ферментов системы свертывания крови [1808,1862,1865-1868], сериновых мышечных протеаз [1828], тонина [1869], калликреина [1870], эластазы [1843,1871-1874], микробных сериновых протеаз [1846,1859,1860,1875-1877], папаина [1819,1820], пепсина и других аспартатных протеаз [1082,1830,1878-1887], карбоксипептидаз [1768,1806], термолизина [1888,1889], аминопептидаз [985,1890] и ряда других ферментов [448,1053,1891-1902].

В результате этих работ было выяснено, что представители разных групп протеолитических ферментов по разному "чувствительны" к вторичным взаимодействиям. Так, трипсин, папаин и некоторые другие ферменты относительно слабо чувствуют удаленные от расщепляемой связи остатки, тогда как пепсин, эластаза и др. изменяют скорость гидролиза на 4-5 порядков (табл.38) [1906].

Таблица 38. Влияние вторичных взаимодействий на катализ протеолитическими ферментами

Фермент	Субстрат		k_{cat}/K_m (II)	Литературный источник
	I	II	k_{cat}/K_m (I)	
Термолизин	ZGly-LeuAla	ZAlaGlyGly-LeuAla	0,09	[1888]
Карбоксипептидаза В	AcGly-Arg	Ac(Gly) ₄ Gly-Arg	1,09	[1806]
Трипсин	ZLysOMe	Z(Ala) ₂ LysOMe	3	[1903]
Папаин	ZValGlu-LeuGly	Z(Gly) ₂ ValGlu-LeuGly	4,7	[1819]
Постпролинов-ая эндопептидаза	ZGlyPro-Leu	ZGlyPro-LeuGlyGly	4,8	[448]
Аминопептидаза А	LeuNH ₂	Leu-LeuLeu	16	[1890]
Тромбин	BocLysOMe	Boc(Gly) ₂ LysOMe	32,5	[1865]
Химотрипсин	AcTyr-GlyNH ₂	Ac(Ala) ₂ Tyr-GlyNH ₂	192	[1858]
Катепсин D	ZPhe-PheOpp*	Z(Ala) ₂ Phe-PheOpp	>720	[1880]
Пепсин	ZPhe-PheOpp	Z(Ala) ₂ Phe-PheOpp	2000	[1880]
Субтилизин BPN'	AcAlaOMe	Ac(Ala) ₂ AlaOMe	2275	[1904]
Эластаза	AcAlaOMe	Ac(Ala) ₂ AlaOMe	3875	[1905]

*Opp - см. табл.39

Вторичные взаимодействия могут по разному влиять на оба кинетических параметра k_{cat} и K_m . Так, для субстратов пепсина наблюдаются сравнительно небольшие колебания K_m при переходе от ди- к тетра- и пентапептидам, а значения k_{cat} изменяются более чем на пять порядков (табл.39).

Таблица 39. Кинетические константы катализируемого пепсином гидролиза пептидов [1878, 1907]

Номер	Субстрат*	k_{cat} , c^{-1}	K_m , MM	k_{cat}/K_m , $M^{-1}c^{-1}$
1	ZAla-Phe(NO ₂)Apm	0,002	1,46	1,4
2	ZPhe(NO ₂)-AlaApm	0,0068	1,30	5,3
3	ZPhe(NO ₂)-ValApm	0,01	0,78	13
4	ZLeu-Phe(NO ₂)Apm	0,011	0,73	14,5
5	ZPhe(NO ₂)-PheArgOMe	0,034	0,92	37
6	ZPhe-Phe(NO ₂)Apm	0,034	0,88	39
7	AcPhe-PheApm	0,102	2,37	43
8	ZPhe(NO ₂)-PheApm	0,052	0,74	70
9	HGlyGlyPhe-PheApm	0,95	3,9	245
10	ZGlyProPhe-PheOpp	0,056	0,14	400
11	ZAsnPhe(NO ₂)-PheApm	0,45	0,84	540
12	ZValPhe(NO ₂)-AlaApm	0,55	0,96	580
13	ZValPhe(NO ₂)-PheApm	0,31	0,17	1850
14	AcPhe(NO ₂)-PheAlaAlaOMe	5,2	0,85	6100
15	ZLeuValPhe(NO ₂)-AlaApm	4,3	0,59	7300
16	ZAlaAlaPhe(NO ₂)-PheApm	43,8	1,51	29000
17	ZGlyHisPhe-PheOpp	15,8	0,44	35900
18	ZGlyGlyPhe-PheOpp	71,8	0,42	$1,8 \cdot 10^5$
19	ZGlyIlePhe-PheOpp	12,6	0,07	$1,8 \cdot 10^5$
20	ZPheGlyPhe-PheOpp	24,6	0,11	$2,25 \cdot 10^5$
21	ZGlyLeuPhe-PheOpp	134	0,03	$4,46 \cdot 10^5$
22	ZAlaGlyPhe-PheOpp	145	0,25	$5,8 \cdot 10^5$
23	ZPheGlyGlyPhe-PheOpp	127	0,13	$9,76 \cdot 10^5$
24	ZGlyAlaPhe-PheOpp	409	0,11	$3,7 \cdot 10^6$
25	ZAlaAlaPhe-PheOpp	282	0,04	$7,05 \cdot 10^6$

* Apm - $NH(CH_2)_3N$  O; Opp - $O(CH_2)_3N$  ⁺; место расщепления показано дефисом.

В то же время изменение длины пептидов - субстратов химотрипсина - приводит к изменениям как k_{cat} , так и K_m в пределах двух порядков (табл.40).

Не только длина пептида, но и характер остатков, удаленных от расщепляемой связи, играют важную роль в ферментативном их расщеплении. Сравнение пептидов 18, 24 и 25 в табл.39 показывает, что замена глицина на аланин в положении P_2 приводит к увеличению k_{cat}/K_m более, чем на порядок. В то же время аналогичная замена в положении P_3 увеличивает эту константу только в два раза. В случае субстратов химотрипсина характер отщепляемого остатка аминокислоты резко меняет субстратные свойства дипептидов - введение в P'_1 аланина вместо глицина увеличивает k_{cat}/K_m в 20 раз, замена же на валин почти не изменяет константу скорости; введение пролина приводит к потере субстратных свойств (K_t 75 MM) [18261].

Вторичная специфичность не обязательно монотонно затухает с удалением от расщепляемой связи. У сериновых протеаз - трипсина и химотрипсина - существ-

Таблица 40. Кинетические параметры гидролиза пептидов α -химотрипсином [1825,1841,1858]

Субстрат*	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , mM	$k_{cat}/K_m \cdot 10^{-3}$, M ⁻¹ с ⁻¹
AcPhe-NH ₂	0,22	21	0,01
AcPheGlyNH ₂	0,14	14,6	0,0096
AcPhe-AlaNH ₂	2,8	15,0	0,186
AcProPhe-NH ₂	0,7	24	0,029
AcAlaProPhe-NH ₂	2,3	2,2	1,04
AcProAlaPhe-NH ₂	0,44	18	0,024
AcAlaPhe-GlyNH ₂	0,355	23,2	0,015
AcProPhe-GlyNH ₂	0,705	14,9	0,051
ZGlyProPhe-NH ₂	0,096	2,4	0,04
ZGlyProPhe-GlyNH ₂	0,08	2,0	0,04
ZGlyProPhe-LeuNH ₂	0,225	1,5	0,15
ZGlyProPhe-LeuAla	0,35	0,5	0,7
ZGlyProPhe-GlyGly	0,26	1,3	0,2
ZGlyProPhe-GlyLeu	0,68	0,4	1,7
AcProAlaProPhe-NH ₂	2,8	3,4	0,82
AcProAlaProPhe-AlaNH ₂	18,7	1,6	11,7
AcProAlaProPhe-GlyNH ₂	11,0	4,6	2,39
AcProAlaProPhe-AlaAlaNH ₂	36,6	0,83	44
AcProAlaProPhe-AlaAlaAlaNH ₂	37	0,82	45
AcProAlaProPhe-PheNH ₂	8,0	0,21	38,1

*Место расщепления показано дефисом.

венное значение имеют взаимодействия P_3-S_3 и P_5-S_5 , тогда как взаимодействия в "четных" подцентрах мало влияют на скорость гидролиза [1908]. На примере эластазы было показано [1844], что взаимодействия P_3-S_3 проявляются при ацилировании фермента субстратом. В случае этого фермента переичная специфичность зависит от длины субстрата.

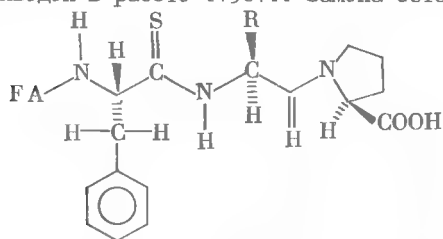
По-видимому, общим является то обстоятельство, что вторичная специфичность в данном локусе зависит от характера взаимодействий в другом (или других) локусах (см., например, табл.41).

Таблица 41. Отношение k_{cat}/K_m в субстратах типа Z-X-A-ArgpNa*

A	X ₁	X ₂	$(k_{cat}/K_m)_{X_1} : (k_{cat}/K_m)_{X_2}$				
			Тромбин	Фактор Ха	Фактор XIa	Фактор XIIa	C-белок
Gly	Phe	Gly	1,87	1,89	2,7	0,26	3,44
Phe	Phe	Gly	9,2	0,14	0,5	0,82	0,46

*По данным [1868].

Отмечена также зависимость скорости гидролиза от состояния ионизации удаленной от гидролизующейся связи группы. Так, замена в брадикине С-концевой карбоксильной группы на карбоксамидную снижает скорость гидролиза Phe5-Ser6 связи в 2,5 раза, но не влияет на расщепление связи Pro7-Phe8 эндологопептидазой В [1895]. Интересный пример роли конформационного состояния субстрата на его чувствительность к гидролизу дипептидил-карбоксипептидазой приведен в работе [1901]. Замена остатка глицина в положении R_1 соединения:



$R = H$ или CH_3 , $FA =$ фуруоилакрилоил

на аланин делает субстрат нечувствительным к гидролизу. Анализ ЯМР-спектров этих веществ и модели фермента позволили предположить, что в продуктивной конформации комплекса Михаэлиса метильная группа аланинового остатка наталкивается на атом серы.

Наконец, следует отметить, что вторичная специфичность может сильно меняться в зависимости от вида организма. Так, ренин человека эффективно гидролизует ангиотензиноген и человека и собаки, тогда как ренин собаки не расщепляет ангиотензиноген человека [1800, 1886]. Это проявляется и на уровне пептидных субстратов, моделирующих N-концевую последовательность ангиотензиногенов.

4.3.1.5 Третичная и четвертичная специфичность.

Ограниченный протеолиз

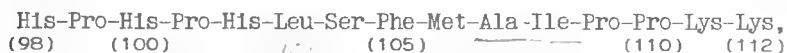
При анализе расщепления белков протеолитическими ферментами возникает новая проблема, связанная с пространственной структурой субстратов. Этой проблеме посвящены многочисленные обзоры [1909-1913]. Известно, что нативные белки, как правило, значительно более устойчивы к протеолизу, чем денатурированные (см., например: [1909, гл.5]). Это привело Линдерстрем-Ланга еще в 1952 г. к теории, согласно которой протеолиз нативных белков идет через стадию их денатурации [1914], причем сама протеиназа может способствовать денатурации, т.е. выступать как денатураза. Процесс может идти в зависимости от отношения скоростей демаскирования пептидной связи (k_d) и ее гидролиза (k_h) по "последовательному" ($k_d < k_h$) или "параллельному" (zipper) механизму ($k_d > k_h$). Тип механизма может зависеть от природы субстрата, протеиназы и условий реакции, в частности концентрации продуктов гидролиза [1915]. Эти представления согласуются с множеством экспериментальных фактов и на их основе были разработаны методы измерения скорости разворачивания белков. Оказалось [1916], что скорости разворачивания лизоцима и РНКазы, измеренные по скорости протеолиза разными ферментами, совпадают между собой и со скоростью денатурации, измеренной независимым методом. В пользу таких представлений говорят также факты значительно большей чувствительности к протеолизу апоферментов, чем холоферментов [1917, 1918].

Вместе с тем известны, и все более множатся, случаи протеолиза нативных белков, в основном, случаи так называемого *ограниченного протеолиза* [1909, 1919], или *процессинга*. Сюда относятся давно известные процессы активации зимогенов (см. гл.5), образования биологически активных пептидных гормонов, процессы экспорта белков из клетки и др.

Точки ограниченного протеолиза определяются, во-первых, первичной и вторичной специфичностью гидролизующего фермента. Так, например, энтеропептидаза, имеющая трипсиноподобную специфичность, расщепляет связь, образованную карбоксильной группой лизина в последовательности AspAspAspAspLys трипсиногенов [1920, 1921]. Процессинг предшественников пептидных гормонов часто идет путем расщепления связи двух остатков основных аминокислот или связи, образованной одним из этих двух остатков с другой аминокислотой [1815, 1922]. Очень часто вблизи основного остатка имеется остаток пролина, создающий, по-видимому, особую конформацию расщепляемого участка [1816, 1923]. Локальная конформация расщепляемого участка – это второй важный фактор ограниченного протеолиза. Было показано, что обычно расщеплению подвергаются связи, расположенные в подвижных петлях белковых молекул или участках, соединяющих компактные субглобулы – домены [1917]. Так, например, пепсин подвергается расщеплению внешними протеазами и автокаталитически в области участка цепи, соединяющего два домена с отщеплением 46-членного C-концевого полипептида [1924]. Часто сайты процессинга расположены в "омега-петлях" – участках из 6–16 остатков свернутых так, что расстояние между их N- и C-концевыми остатками не превышает $10 \text{ \AA}$ [1913].

Анализ большого числа структур предшественников пептидных гормонов показал, что место процессинга расположено в области с высокой вероятностью образования β -шпильки и по соседству с высокоупорядоченными вторичными структурами [1925]. Наличие вторичной структуры важно для расщепления не только белков, но и относительно коротких пептидов [1926]. Наконец, еще два фактора, важных для протеолиза нативных белков, – это доступность гидролизуемой связи и подвижность расщепляемого участка [1927–1930]. Оба эти фактора могут быть смоделированы из данных рентгеноструктурного анализа или установлены экспериментально на основании значений температурного В-фактора в кристалле [1928], причем наблюдается хорошее совпадение предсказанных и экспериментально установленных мест протеолиза. Несомненно, что только реализация всех указанных условий приведет к эффективному расщеплению белка в нужном для функционирования месте.

Ограниченный протеолиз был подробно исследован в количественном аспекте на примере расщепления α_0 -казеина и других казеинов химозином и родственными протеиназами [1931–1937]. Было показано, что расщепление связи Phe-Met в пептиде:



являющемся пептидом 98–112 α_0 -казеина, заметно превосходит скорость расщепления самого белка ($k_{\text{cat}} = 68,7 \text{ с}^{-1}$; $K_m = 0,049 \text{ мМ}$ [1933]). Решающим является переход от пептида 104–111 к пептиду 103–111, т.е. введение остатка Leu, что приводит к увеличению k_{cat}/K_m в 330 раз. Последовательность 98–102 сн-

жает K_m более чем на порядок [1931]. Эти данные говорят о преимущественной роли вторичной, а не третичной специфичности в катализе (см. также гл.6).

Довольно подробно исследована кинетика гидролиза фибриногена и пептидов, моделирующих участки протеолиза этого белка тромбином [1866,1867,1938]. Было установлено, что тромбин сначала отщепляет фибринопептид А от α -цепи, после чего происходит полимеризация дез-А-фибриногена и лишь затем отщепляется фибринопептид В [1938]. Значение k_{cat}/K_m для отщепления фибринопептида А достигает $11,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Некоторые данные о скорости ограниченного протеолиза белков приведены в табл.42.

Таблица 42. Кинетические параметры ограниченного протеолиза некоторых белков

Фермент	Субстрат	pH	$k_{cat}, \text{ c}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{ M}$	$k_{cat}/K_m, \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	Литературный источник
Химотрипсин	Панкреатический трипсиновый ингибитор	7,5	$1,4 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-6}$	7	[1939]
Трипсин быка	То же	7,5	$8,7 \cdot 10^{-10}$	$8,7 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^4$	[1939]
То же	Соевый трипсиновый ингибитор	8	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^6$	[1939]
"	Трипсиноген быка	8,1	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,4	6,25	[1940]
"	" свиньи	8,1	$5,5 \cdot 10^{-3}$	0,48	11,4	[1940]
"	Химотрипсиноген А	—	0,18	1,1	163	[1940]
"	" В	—	1,6	0,57	$2,8 \cdot 10^3$	[1940]
Трипсин 1 <i>Dermastreria imbricata</i>	Панкреатический трипсиновый ингибитор	8,2	0,0016	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^6$	[1939]
То же	Соевый трипсиновый ингибитор	8	0,12	$3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^5$	[1939]
Калликреин ткани человека	Высокомолекулярный кининоген		0,43	0,005	$8,6 \cdot 10^4$	[1941]
То же	Низкомолекулярный кининоген		1,83	0,0125	$14,6 \cdot 10^4$	[1941]
Энтерокиназа быка	Трипсиноген	5,6	1,48	$7 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^5$	[1920]
То же свиньи	То же	5,6	4,8	$7 \cdot 10^{-2}$	$6,8 \cdot 10^4$	[1942]
Химозин	α -Казеин	6,6	68,9	0,05	$1,4 \cdot 10^6$	[1934]
	β -Казеин	6,6	0,56	0,007	$0,8 \cdot 10^5$	[1934]
Ренин	Ангиотензиноген	≈6	50	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^7$	[923]

Известно много примеров ограниченного протеолиза различных ферментов (см. в: [1909]), что, по-видимому, имеет регуляторное значение.

Следует кратко остановиться на процессинге сигнальных пептидов и вирусных полипротеинов. Сигнальная последовательность прокариотических и эукариотических белков организована таким образом, что имеется кластер положи-

тельно заряженных остатков на N-конце, центральный гидрофобный кор (около 12 остатков) и полярный C-концевой фрагмент, характеризующийся упорядоченной вторичной структурой. Месту расщепления сигнальной протеиназой предшествует последовательность трех остатков A-X-B, где A - Ala, Leu, Val, Ile, а B - Ala, Gly, Ser [1854,1943]. Сама сигнальная протеиназа (у *Escherichia coli* [1944]) содержит внутренний сигнальный пептид (остатки 70-76), важный для связывания с мембраной.

Многие РНК-содержащие вирусы образуют в ходе созревания полибелок, который затем процессирует под действием входящей в его последовательность вирусной протеазы [654,1945]. "Нарезание" вирусных белков обычно начинается с аутопроцессинга и происходит строго по сайтам, разделяющим белки с различной функциональностью. Эти сайты могут быть образованы различными парами аминокислотных остатков, например GlnGly, TyrGly и AsnSer у пикориавирусов, PhePro, TyrPro и др. у ретровирусов и т.д. Чем в данном случае определяется специфичность расщепления остается неясным. Более того, у ретровирусов, как известно, аспаратная протеиназа, входящая в состав полибелка, функционирует в виде димера. Остается открытым вопрос об аутоактивации этого фермента.

Внутриклеточный нелизосомальный протеолиз происходит с участием АТР-убикитин зависимой системы протеолиза [1910,1912]. В эту систему входит небольшой белок убикитин (9 кДа) и несколько ферментов, катализирующих присоединение убикитина его C-концевым глицином к ϵ -аминогруппе гидролизуемого белка, расщепление белка в образовавшемся конъюгате и регенерацию убикитина. Эта система гидролизует преимущественно аномальные клеточные белки [1946,1947]. Предполагается, что узнавание аномальных белков связано с состоянием их N-концевой аминогруппы. Ацетилирование этой группы препятствует гидролизу белка убикитинзависимой системой протеолиза [1948]. Кроме этой системы в клетке, по-видимому, функционирует АТР-зависимая, но убикитиннезависимая система протеолиза с участием высокомолекулярных протеиназ - протеосом [1949].

Имеется много примеров влияния четвертичной структуры белка на его устойчивость к протеолизу. Так, дрожжевая гексокиназа устойчива в виде димера к протеолизу дрожжевыми протеазами, но при диссоциации димера образующиеся мономеры легко отщепляют фрагмент, важный для димеризации [1950]. Аналогичное явление наблюдается у фосфорилáзы А при действии трипсина и глюкозы, когда тетрамерный белок диссоциирует на димеры [1951]. Еще один пример проявления четвертичной специфичности протеаз - действие трипсина на тетрамер ($\alpha_2\beta_2$) триптофансинтазы [1952]. Оказалось, что β -субъединицы не подвергаются расщеплению в тетрамере, но если подвергнуть фермент диссоциации, то они расщепляются трипсином. α -Субъединицы ступенчато расщепляются ферментом так, что они теряют активность. В составе полного фермента реализуется лишь первая ступень гидролиза без потери активности триптофансинтазы. Таким образом, четвертичная структура белка-субстрата может в значительной степени изменить ход гидролитического расщепления за счет маскирования определенных мест протеолиза или за счет конформационных изменений в этих положениях.

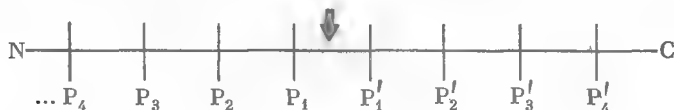
4.3.2. Количественные зависимости структуры субстратов и их реакционной способности

Рассмотренные выше данные не выходят за рамки качественных закономерностей, не позволяющих делать какие-либо предсказания в отношении реакционной способности субстратов в реакциях ферментативного гидролиза. Ниже мы рассмотрим возможности количественного анализа специфичности.

4.3.2.1. Статистический анализ специфичности

Один из методов количественного анализа специфичности протеолитических ферментов заключается в статистическом анализе частоты расщепления различных пептидных связей в пептидах и белках [1953-1956]. Соответствующие исходные данные можно найти в работах по структурному анализу последовательности аминокислот в белках (см., например: [1197]).

Метод заключается в подсчете частоты встречаемости каждой аминокислоты в каждом положении гидролизующей последовательности и анализе достоверности наблюдаемых отклонений от случайного распределения. В качестве примера приведем расчет специфичности свиного пепсина [1955] по отношению к остатку Ile в положении P_1 .



Общее число исследованных пептидов	500
Общее число остатков Ile	372
Число остатков Ile в положении P_1	3

Частота встречаемости Ile в положении P_1 : $A_{1, \text{Ile}} = (3/372)100 = 0,81$.

Средняя частота встречаемости Ile в положении P_1 : $A_1 = \sum_0^{20} A_{1,j} / 20 = 4,99$,

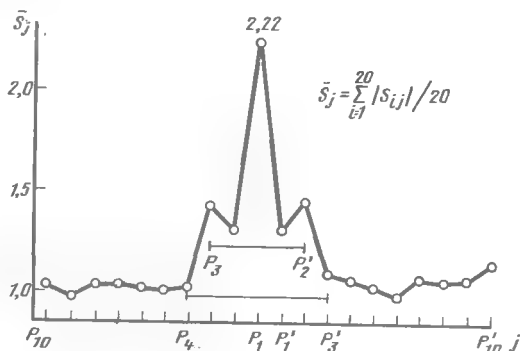
где $A_{1,j}$ - частота встречаемости каждой из 20 аминокислот в положении P_1 . Отклонение от случайного распределения: $K_{1, \text{Ile}} = 0,81/4,99 = 0,16$. Граница доверительного интервала $\Delta\chi_1 = \epsilon\sigma$, где $\epsilon=2$ (для $\alpha=0,95$) и $\sigma\sqrt{S_n}$ - среднее квадратичное отклонение $K_{1,j}$ от единицы; $\Delta\chi_1 = -0,84$. Индекс специфичности $S_{1, \text{Ile}} = -(1-\Delta\chi_1)/K_{1, \text{Ile}} = -5,25$.

В результате расчета можно получить "индексы специфичности" ($S_{i,j}$), характеризующие предпочтительность ($S_{i,j} \geq +1$), нежелательность ($S_{i,j} \leq -1$) и индифферентность ($+1 > S_{i,j} > -1$) фермента к данной аминокислоте в данном положении гидролизующей последовательности.

Для субстратов пепсина индексы специфичности для положения P_1 наиболее и наименее предпочтительных остатков составляют: Leu +2,46, Phe +2,28, Trp 1,67, Glu +1,49, Ile -5,25, Arg -6,23.

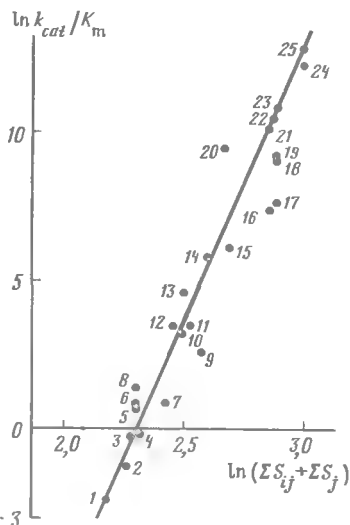
Анализ индексов специфичности позволяет сделать ряд интересных выводов. Во-первых, в положении P'_1 наблюдается корреляция индексов специфичности с гидрофобностью боковых цепей (см. разд.1.4), тогда как в положении P_1 и других такая корреляция отсутствует. Во-вторых, в положении P_1 крайне нежелательны изолейцин, положительно заряженные аминокислотные остатки и Pro

Рис.55. Зависимость среднего индекса специфичности ($\bar{S}_j$) пепсина от положения аминокислотных остатков относительно расщепляемой связи [1955]



(индекс специфичности для этого остатка $-\infty$, т.е. он не встречается в этом положении ни в одном из исследованных пептидов). Значительный интерес представляют средние абсолютные значения индексов специфичности для каждого положения. Эта величина характеризует максимальное положительное и отрицательное отклонение от случайного распределения аминокислотных остатков в данном положении, т.е. "жесткость" требований фермента к структуре боковой цепи. Эта величина максимальна для положения P_1 , значительно отклоняется от единицы в положениях P_3 , P_2 и P'_1 , P'_2 и близка к единице для остальных положений (рис.55). Это означает, что пепсин специфичен в основном к структуре остатка, образующего расщепляемую связь своей карбоксильной группой, а общая длина связывающего субстрат участка активного центра пепсина соответствует 6-7 аминокислотным остаткам. Аналогичная картина наблюдается и для химозина [1932].

Рис.56. Зависимость констант скорости второго порядка от суммарных индексов специфичности пепсина свиньи [1907]
Нумерация соответствует приведенной в табл.39



Рассчитанные таким способом индексы специфичности, по-видимому, отражают вклад каждого остатка аминокислоты в общую скорость расщепления данной связи пепсином. Это видно из того, что существует четкая корреляция между суммарными индексами специфичности для синтетических пептидов и константами скорости (k_{cat} и k_{cat}/K_m) их гидролиза, катализируемого этим ферментом (рис.56) [1907].

Линейная зависимость кинетических констант и суммарных индексов специфичности описывается формулами:

$$\ln k_{cat} = 13,75 \pm 0,67 \ln(\sum S_{ij} + \bar{S}_j) - 31,34 \pm 1,75, \quad (44)$$

$$\ln \frac{k_{cat}}{K_m} = 16,13 \pm 1,08 \ln(\sum S_{ij} + \bar{S}_j) - 36,77 \pm 2,82. \quad (45)$$

Вместе с тем, корреляция между суммарными индексами специфичности и величинами K'_m отсутствует.

Корреляции, приведенные на рис.56, являются примером зависимости структура субстрата – скорость гидролиза, представленной в общем виде на рис.54. Наклон графика $\ln k_{cat}/K'_m$ от $\ln(\sum S_{i,j} + \sum S_{j,j})$, очевидно, характеризует специфичность пепсина.

Несколько иной подход к статистическому анализу специфичности пепсина [1956] основан на расчете вероятности расщепления данной связи, которая выражается как отношение числа расщепляемых связей данного типа к общему числу таких связей в рассмотренных последовательностях. Например, в исследованных авторами 177 пептидах и белках (содержащих суммарно 6910 пептидных связей) остаток аланина встречается 502 раза и в 82 случаях этот остаток образует своей карбоксильной группой расщепляемую связь. Вероятность расщепления составляет $82/502=0,16$.

Хотя статистические индексы специфичности лишены какого-либо определенного физического смысла и являются просто эмпирическими параметрами, корреляции типа (44) и (45) ценны в практическом отношении. Они позволяют с известной точностью рассчитывать *a priori* константы ферментативного гидролиза любых последовательностей аминокислот. Так, на основании индексов специфичности был предложен субстрат пепсина – $\text{ProThrGluPhe-Phe}(\text{NO}_2)\text{ArgLeu}$, один из наиболее быстро ($k_{cat}/K'_m \approx 5,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) гидролизующимся этим ферментом [1983].

Рассмотренные статистические методы не всегда дают удовлетворительные результаты в отношении предсказания скорости гидролиза. Это может объясняться несколькими причинами. Во-первых, исходные данные по расщеплению пептидов и белков в ходе структурных исследований не являются количественными и наблюдаемые результаты могут сильно зависеть от условий эксперимента. Во-вторых, если первичная специфичность (например, по остатку P_1) вносит основной вклад в скорость гидролиза, то вариации удаленных аминокислотных остатков будут слабо проявляться в опытах по определению структуры, но могут заметно влиять на начальные скорости, полученные в кинетическом эксперименте. Наконец, в тех случаях, когда структура субстрата сказывается как на величине k_{cat} , так и на K'_m , исходные данные в зависимости от соотношения $[S]_0$ и K'_m могут отражать изменения или максимальной скорости или отношения k_{cat}/K'_m . По-видимому, эти факторы ответственны за плохую корреляцию суммарных индексов специфичности и кинетических констант гидролиза синтетических пептидов (см. табл.40) в случае пептидных субстратов α -химотрипсина.

Еще один способ статистического анализа специфичности основан на использовании метода Фри и Вильсона [1957], в соответствии с которым любой переменный фактор, связанный со структурой, может быть представлен суммой аддитивных вкладов отдельных элементов структуры

$$k_n = \sum_t \alpha_{t,n} + \mu \quad (46)$$

при условии, что

$$\sum_n \alpha_{t,n} = 0, \quad (47)$$

где n – молекула субстрата в данной серии субстратов; t – положение остатка

в последовательности (P_1 , P_2 и т.д.); α - вклад остатка в измеряемый параметр k ; μ - суммарный вклад для всей серии субстратов. Если имеется подходящим образом подобранная серия субстратов, то, решая систему уравнений (46) и (47), можно получить значения вкладов каждой аминокислоты в каждом положении в измеряемую кинетическую константу. Этот вклад, в принципе, не зависит от того, в состав какого субстрата входит данный остаток, а только от типа аминокислоты и от ее положения в последовательности. Таким образом, на основе рассчитанных вкладов можно предсказать значения кинетических констант для любого пептида. Этот метод был использован для анализа специфичности субтилизина, трипсина, тромбина и некоторых других протеаз [1958-1961].

4.3.2.2. Корреляции типа линейных зависимостей свободных энергий

Рассмотренные выше корреляции имеют тот недостаток, что они не оперируют с какими-либо параметрами, характеризующими физико-химические свойства субстратов. Вместе с тем очевидно, что именно последние определяют способность субстрата к взаимодействию с ферментом.

Корреляции типа линейных соотношений свободных энергий для ферментативного гидролиза были получены для ограниченного числа субстратов некоторых протеаз. Наиболее подробно в этом отношении изучены сложные эфиры ациламинокислот - субстраты α -химотрипсина, трипсина и некоторых других ферментов [1962-1964].

Влияние структуры боковой цепи. Из данных, приведенных в табл.43, можно видеть, что при увеличении размера боковой цепи константа скорости второго порядка (k_2/K_s) катализируемого химотрипсином гидролиза возрастает, хотя и имеются отдельные исключения (производные валина, изолейцина и отчасти

Таблица 43. Кинетические константы катализируемого α -химотрипсином гидролиза эфиров N-ацетиламинокислот (pH 7,8; 25°C; 0,1 M KCl) [1723]*

Номер	Субстрат	k_2, c^{-1}	k_3, c^{-1}	$K_s \cdot 10^3, M$	$k_{-2}, M^{-1} c^{-1}$	$k_2/K_s, M^{-1} c^{-1}$
1	AcGlyOMe	0,109	0,298	702	0,15	0,155
2	AcAlaOMe	2,27	5,67	1270	7,6	0,018
3	AcButOMe	8,81	1,68	417	3,1	21,1
4	AcValOMe	0,98	0,21	500	0,15	1,96
5	AcNvIOMe	55,8	9,3	100	14,3	558
6	AcNleOMe	103	19,1	34,4	34,4	2990
7	AcIleOMe	1,0	0,18	100	0,09	10
8	AcPheOMe	796	111	7,63	207	$1,04 \cdot 10^5$
9	AcTyrOEt	5000	200	17,2	67	$2,9 \cdot 10^5$
10	AcTrpOMe**	730	29	2,52	-	$2,9 \cdot 10^5$

*Константы обозначены в соответствии с кинетической схемой (30).

**pH 7,0; 25°C; 3,17% CH_3CN [1761].

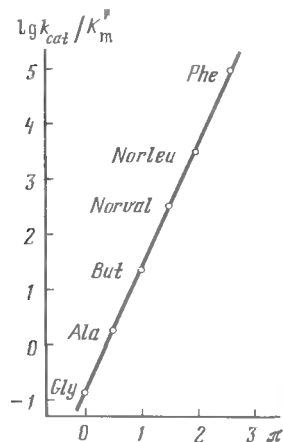


Рис. 57. Зависимость константы скорости 2-го порядка реакции химотрипсина с метиловыми эфирами N-ацетиламинокислот от гидрофобности боковой цепи субстрата (pH 7,8; 25°C) [1965]

триптофана). Очевидно, что скорость гидролиза в этой серии субстратов коррелирует с гидрофобными свойствами боковых цепей (рис. 57), однако стерические факторы играют определенную роль как в связывании, так и в катализе.

Наблюдается также линейная корреляция между гидрофобностью боковых цепей субстратов и константами скоростей ацилирования и деацилирования химотрипсина [1965, 1966].

Стерические эффекты боковой цепи проявляются в константах скорости ацилирования [1967, 1968] и деацилирования [1969] α-химотрипсина эфирами алифатических кислот, причем наклон графиков зависимостей k_2/K_s и k_3 от E_s примерно равен единице. Аналогичные зависимости были получены в работах [19726, 1970-1974]. Наряду с индексом гидрофобности было предложено [1975] использовать значение молекулярной рефракции.

Если не учитывать стерические эффекты, то для метиловых эфиров N-ацетиламинокислот можно написать корреляционное уравнение [1973]:

$$\lg k_2/K_s = (2,2 \pm 0,1)\pi - 0,9 \pm 0,05. \quad (48)$$

Это уравнение показывает, что специфичность в этом ряду субстратов зависит исключительно от гидрофобности боковой цепи. Иное положение наблюдается для субстратов с короткой или разветвленной боковой цепью, например для нитрофениловых эфиров алифатических карбоновых кислот. В этом случае гидрофобность заместителя проявляется слабо и основной вклад в скорость ацилирования фермента вносят индукционные и стерические эффекты [1964, 1972]:

$$\lg k_2/K_s = (2,18 \pm 0,17)\sigma^* + (0,53 \pm 0,1)E_s + (3,46 \pm 0,17). \quad (49)$$

Следует отметить также, что для ферментативного катализа в отличие от неферментативного корреляционные уравнения требуют введения так называемого параметра специфичности, характеризующего соответствие субстрата и активно-

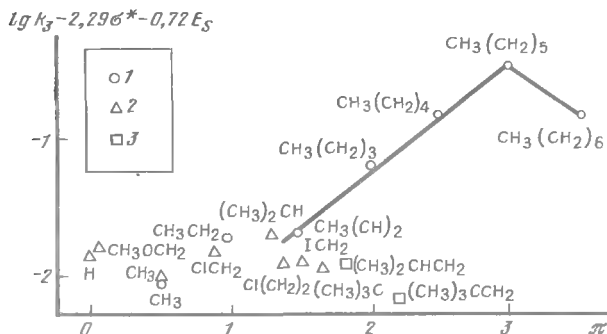


Рис. 58. Зависимость констант скоростей деацилирования ацилхимотрипсинов - производных алифатических карбоновых кислот - от констант гидрофобности Ганца для аполлярных фрагментов ацильной группы: взято из: 1- [1976]; 2- [1969]; 3- [1972]

го центра фермента [1976]. Для химотрипсинового гидролиза сложных эфиров таким параметром является величина π . Это можно продемонстрировать на примере зависимости константы скорости деацилирования *n*-нитрофениловых эфиров алифатических (и арилалифатических) кислот от индукционных, стерических и гидрофобных эффектов (рис.58). В координатах $\lg k_3 - 2,290^* - 0,72E_s$ от π получается зависимость, проходящая через максимум, указывающий на ограниченность размеров активного центра. В целом, зависимость характеризуется тремя участками: а) участком, не зависящем от гидрофобности алкильной цепи, что характерно для субстратов с короткой или разветвленной ацильной группой; для этих субстратов скорость деацилирования определяется индукционными и стерическими эффектами; б) участком линейной зависимости с наклоном около единицы для неразветвленных субстратов с числом метиленовых звеньев, равным или большим трех, где скорость зависит от гидрофобности заместителя; в) участком с отрицательным наклоном для субстратов с числом CH_2 -групп, большим шести, где проявляется ограниченность длины связывающего субстрат участка активного центра.

Необходимо отметить, что амиды *N*-ацетиламинокислот выпадают из указанных корреляций, однако данных по влиянию боковой цепи субстрата на гидролиз таких амидов очень мало.

Сложнее обстоит дело в случае трипсина. Константы скорости второго порядка (k_2/K_m) для реакции трипсина с эфирами ациламинокислот, содержащими короткую боковую цепь (глицин, аланин, масляная кислота), близки соответствующим константам их гидролиза химотрипсином (табл.44). То же самое наблюдается и для констант скорости деацилирования различных ацилхимотрипсинов и ацилтрипсинов [1977] (ср. табл.43). Однако скорость гидролиза трипсином резко возрастает при введении в боковую цепь на достаточном удалении от C_α -атома положительного заряда.

Таким образом, на стадии ацилирования специфичность трипсина определяется как гидрофобными взаимодействиями боковой цепи субстрата с ферментом, так и наличием заряда, причем последнее увеличивает скорость ацилирования в

Таблица 44. Кинетические параметры гидролиза сложных эфиров ациламинокислот трипсином [1977-1979]

Субстрат	$k_2, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$	$K_s \cdot 10^3, \text{M}$	$k_2/K_s, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$
AcGlyOEt	0,032	0,1	830	0,04
AcAlaOEt	0,25	—	36	6,9
AcButOMe	7,6	1,52*	0,47	16
AcPheOMe	55	173	110	$5 \cdot 10^2$
AcTrpOMe	—	31	—	—
AcTyrOEt	36	193	47	$7,6 \cdot 10^2$
TosOrnOMe	54	5,4	16	$3,4 \cdot 10^2$
BzLysOMe	$5,9 \cdot 10^3$	22,3	4,9	$1,2 \cdot 10^6$
BzArgOMe	$2 \cdot 10^4$	23,3	2,2	$4,6 \cdot 10^6$

* Для бензоилпроизводного.

10^2 – 10^3 раз. Что же касается стадии деацилирования (k_3), то здесь зарядовое взаимодействие, по-видимому, не играет существенной роли: величины k_3 для ацилхимотрипсинов и ацилтрипсинов весьма близки.

Следует отметить, что в отношении *n*-нитрофеноловых эфиров карбоновых кислот трипсин менее чувствителен к гидрофобности ацильной группы. Соответствующее корреляционное уравнение для этой серии субстратов [1980]

$$\lg \frac{k_2}{K_m} = (0,34 \pm 0,06)\pi - (4,4 \pm 0,1) \quad (50)$$

имеет коэффициент при π вдвое меньший, чем этот же коэффициент для гидролиза таких субстратов α -химотрипсином (0,74) [1970]. Корреляционные уравнения рассмотренного типа были предложены для субстратов папаина [1981] и термолизина [1982].

Еще один пример корреляции структуры субстратов и их реакционной способности – это гидролиз пептидов карбоксипептидазой А. Для серий субстратов ZX-Phe и ZGly-X, где X – варьируемый аминокислотный остаток, была обнаружена [1738] линейная зависимость $\lg K_m$ от гидрофобности боковой цепи остатка X (рис. 59,а). Однако каталитическая константа (k_{cat}) для этих веществ практически не зависит от гидрофобной боковой цепи (рис. 59,б).

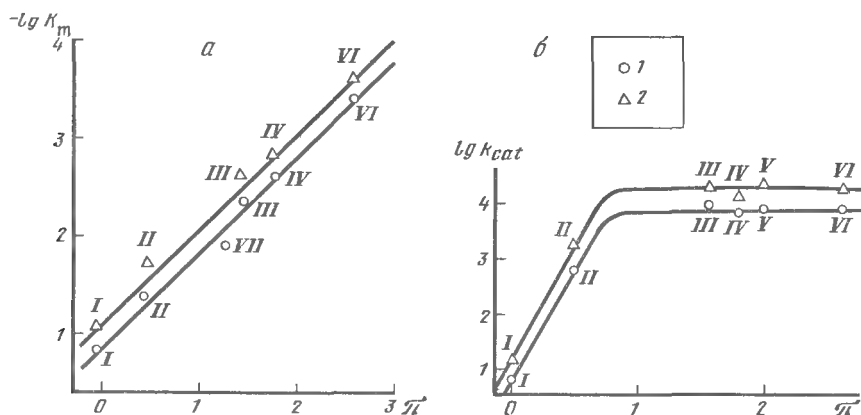
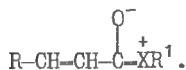


Рис. 59. Зависимости констант связывания (а) и каталитических констант гидролиза (б) субстратов ZGlyGlyX в реакции с Zn^{2+} (1) и Co^{2+} (2) карбоксипептидазой А от констант гидрофобности Ганча [1738]

Заместитель (X): Gly (I); Ala (II); Nva (III); Leu (IV); Nle (V); Phe (VI); Val (VII)

Зависимость величины k_{cat}/K_m от размеров боковой цепи *n*-нитрофенилкарбоксилатов была исследована также на примере эластазы [1983]. Она оказывается очень сходной с зависимостью, наблюдаемой в случае химотрипсина (см. рис. 58) с той разницей, что максимум ее приходится на эфир масляной кислоты.

Следует остановиться на резонансных эффектах ацильной группы в реакциях ферментативного гидролиза. Резонансный эффект заместителя в общем случае должен снижать реакционную способность производных карбоновых кислот, стабилизируя резонансную форму



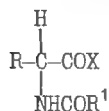
Немногочисленные данные по гидролизу химотрипсином производных коричной кислоты показывают, что это действительно наблюдается на стадии деацилирования, но не наблюдается при ацилировании фермента (табл.45).

Таблица 45. Константы щелочного и катализируемого химотрипсином гидролиза производных коричной кислоты [1987]

Субстрат	$k_2, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$	$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOMe}$	0,028	0,0125	1,19
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{COOMe}$	0,02	0,18	7,7

Ацилферменты, содержащие ненасыщенные ацильные группы, заметно отличаются по спектральным свойствам от соответствующих модельных соединений – наблюдается значительный сдвиг максимума поглощения в длинноволновую область [1984-1986].

Влияние ациламиногруппы. Изменение характера ациламиногруппы в субстратах химотрипсина типа



также сказывается на наблюдаемых величинах кинетических констант. Удаление всей этой группировки приводит к снижению как величины k_2 , так и величины k_3 , тогда как значения K_s практически не изменяются.

Замена группы NH на атом кислорода или ее метилирование также приводит к резкому снижению каталитических констант (табл. 46).

Замена ацетаминогруппы в метиловом эфире ацетил-*L*-фенилаланил-*L*-фенил-

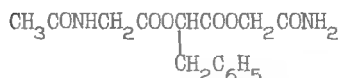
Таблица 46. Кинетические параметры катализируемого химотрипсином гидролиза соединений $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{X})\text{COOC}_2\text{H}_5$

X	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m' \cdot 10^3, \text{M}$	$k_2, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$	$K_s \cdot 10^3, \text{M}$	Литературный источник
H	0,15	0,69	0,67	0,2	3,0	[1965]
OSOC ₂ H ₅	0,6	23	–	–	–	[1988]
N(CH ₃)SOC ₂ H ₅ *	0,023	7,5	0,026	0,25	8,4	[1989]
NHCOCH ₃	96,5	0,9	800	110	7,6	[1965]

*Производные тирозина.

аланина на ацетоксигруппу полностью лишает полученное соединение способности гидролизываться в присутствии пепсина, однако значение константы ингибирования пепсина этим веществом совпадает с K_m исходного субстрата [1990].

Следует отметить, что негативная роль ацетоксигруппы может быть "компенсирована" вторичными взаимодействиями. Так, карбоксаимидометиловый эфир ацетилглицил-L-фенилмолочной кислоты



гидролизуется химотрипсином с более высокой скоростью, чем метиловый эфир N-ацетилфенилаланина ($k_{\text{cat}}=76 \text{ с}^{-1}$, $K_m=0,5 \text{ мм}$) [1991].

Ациламиногруппа вносит практически постоянный, не зависящий от типа ациламинокислоты вклад в ускорение реакции химотрипсином. На стадии деацилирования хорошо выполняется соотношение [1992]:

$$\lg k_3(\text{NHCOCH}_3) \approx \lg k_3(\text{H}) + 2,4, \quad (51)$$

т.е. константа скорости деацилирования увеличивается при переходе от не содержащих ациламиногрупп субстратов к содержащим эту группу примерно в 250 раз.

Увеличение гидрофобности R^1 в ациламиногруппе приводит к уменьшению величины K_s и k_2 так, что соответствующие корреляционные уравнения имеют примерно одинаковый угловой коэффициент, но с разным знаком [1964, с.135]:

$$\lg k_2/K_s = (0,6 \pm 0,1)\pi + \text{const}, \quad (52)$$

$$\lg k_2 = -(0,7 \pm 0,1)\pi + \text{const}. \quad (53)$$

В то же время константа скорости деацилирования (k_3) практически не зависит от гидрофобности остатка R^1 [1970].

Симпатное изменение k_2 и K_s скорее всего свидетельствует об увеличении степени непродуктивного связывания при увеличении гидрофобности ациламиногруппы (см. разд.4.1.4).

Интересные данные были получены [1992] при анализе температурной зависимости констант k_3 для серии содержащих и не содержащих ациламиногруппу суб-

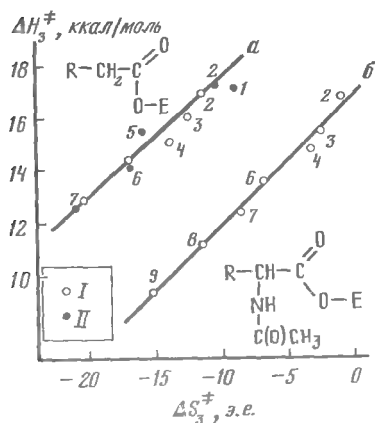


Рис.60. Зависимость энthalпии активации реакции деацилирования ацилхимотрипсинов - производных N-ацетиламинокислот (а) и нормальных алифатических карбоновых кислот (б) от энтропии активации [1992]

$R=\text{CH}_3$ (1); C_2H_5 (2); $n\text{-C}_3\text{H}_7$ (3); $n\text{-C}_6\text{H}_{13}$ (4); H (5); $n\text{-C}_4\text{H}_9$ (6); $n\text{-C}_5\text{H}_{11}$ (7); $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (8); $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}-n$ (9); скорости реакции измерены методами pH-статирования (I) и спектрофотометрии (II)

стратов химотрипсина. Как видно из рис.60, реакция гидролиза субстратов, содержащих одинаковую боковую цепь, но отличающихся наличием ациламиногруппы, протекает с практически одинаковой энтальпией активации и в то же время с сильно различающимися энтропиями активации. Таким образом, ациламиногруппа вносит, по-видимому, энтропийный вклад в ускорение гидролиза специфических субстратов химотрипсина.

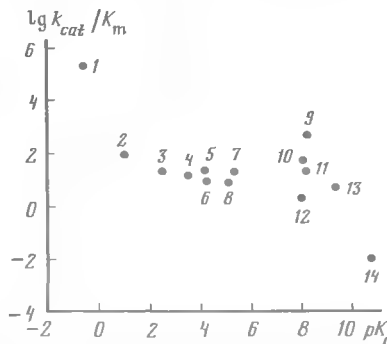
Заместители при α -С-атоме. Замена атома водорода при α -С-атоме производных ациламинокислот на более объемистые группировки приводит к полной потере субстратных свойств [1993,1994]. Однако относительно небольшие группы, введенные в α -положение, все же не препятствуют гидролизу [1995].

Уходящая группа и тип расщепляемой связи. Характер уходящей группы имеет решающее значение в реакционной способности производных карбоновых кислот по отношению к данному нуклеофилу. В ферментативном катализе роль основности уходящей группы может маскироваться ее взаимодействием с ферментом. Для большого числа неспецифических и так называемых полуспецифических субстратов (эфиров, анилидов и некоторых других производных ациламинокислот) зависимость скорости ферментативного катализа от pK_a уходящей группы исследовалась весьма интенсивно, причем в случае катализа химотрипсином [1478,1534, 1996–2002] и пепсином [2003–2005] были получены противоречивые данные. По-видимому, линейная зависимость pK_a уходящей группы и константы скорости ферментативного гидролиза (k_{cat}) наблюдается лишь в относительно узком интервале значений pK_a (рис.61). В целом же для химотрипсинового катализа такая зависимость отсутствует [2000,2001].

Влияние гидрофобности уходящей группы на катализ химотрипсином гидролиза алкилацетатов было исследовано в реакции переноса ацетильной группы на спирты в процессе гидролиза *n*-нитрофенилацетата [2006]. Было показано, что скорость переноса коррелирует с гидрофобностью с угловым коэффициентом, близким к единице, лишь для ограниченного числа спиртов (от этанола до бутанола). Другие спирты подчиняются в этой реакции корреляционным зависимостям с другими угловыми коэффициентами (см. также: [2007]).

Чем же обусловлено значительное различие в скоростях гидролиза амидов и сложных эфиров при катализе сериновыми протеазами? Оказалось [2008–2010], что скорость ферментативного гидролиза различных производных одной и той же ациламинокислоты линейно связана с величиной изменения стандартной свободной энергии реакции (рис.62). Такая зависимость является проявлением известного постулата Хэммонда (см. разд. 3.4.3), в соответствии с которым,

Рис.61. Зависимость константы скорости 2-го порядка от pK_a уходящей группы при гидролизе α -химотрипсином субстратов типа AcTyrX [2001] Заместитель (X): OC_2H_5 (1), $NHC_6H_4NO_2-n$ (2), $NHC_6H_4NO_2-m$ (3), NHC_6H_4Cl-m (4), NHC_6H_4Cl-n (5), $NHC_6H_4OCH_3-m$ (6), $NHC_6H_4OCH_3-n$ (7), $NHC_6H_4CH_3-n$ (8), $NHCH(CH_3)CONH_2$ (9), $NHOH$ (10), $NHCH_2CONH_2$ (11), $NHNH_2$ (12), NH_2 (13), $NHCH_3$ (14)



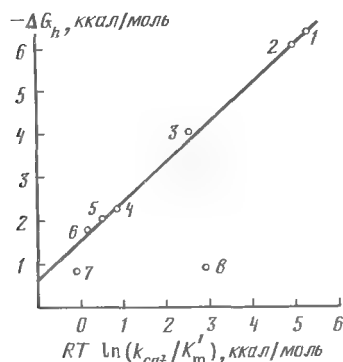


Рис. 62. Зависимость изменения стандартной свободной энергии гидролиза и константы скорости 2-го порядка катализируемого химотрипсина гидролиза [2009]

Субстраты типа $\text{AcPhe}(\text{NO}_2-n)-\text{X}$

Заместитель (X): OC_2H_5 (1), OCH_3 (2),

$\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$ (3), NHC_6H_5 (4), NH_2 (5),

NHNH_2 (6), $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$ (7), $\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$ (8)

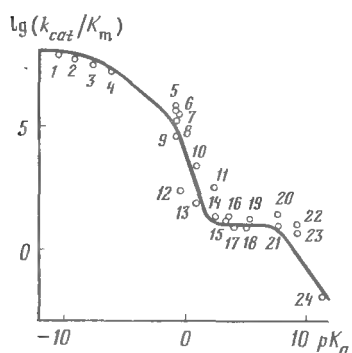
чем выше энергия исходного состояния в мономолекулярной реакции, тем ближе структура переходного состояния к этому исходному состоянию. Другими словами, при прочих равных условиях химотрипсиновый катализ идет тем эффективнее, чем менее стабилизированной является расщепляемая связь. Различие в скоростях гидролиза эфиров и амидов обусловлено исключительно структурой расщепляемой связи, а не особенностями фермент-субстратного взаимодействия.

Указанная корреляция справедлива для "полуспецифических" субстратов, т.е. таких, уходящая группа которых заметно не взаимодействует с ферментом. Эта корреляция может быть описана эмпирическим уравнением:

$$-\Delta G^\circ = 0,931RT \ln \frac{k_{\text{cat}}}{K'_m} + 1,616 \quad (r=0,999). \quad (54)$$

Однако, специфические субстраты, например N-ацетил-*n*-нитрофенилаланил-L-аланиламид, выпадают из нее, поскольку остаток аланина эффективно взаимодействует с активным центром фермента [2011].

Для других ферментов имеется слишком мало данных по скоростям гидролиза в сериях различных производных ациламиноокислот. Линейная зависимость скорости и свободной энергии, по-видимому, выполняется для карбоксипептидазы A [2012], тогда как для пепсина различия в скоростях гидролиза амидных и сложноэфирных (депептидных) субстратов очень невелики [2013].



- 1- $\text{ZTrpOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$; 2- $\text{ZTrpOC}_6\text{H}_4\text{COMe}-n$;
- 3- $\text{ZTrpOC}_6\text{H}_4\text{Cl}-n$; 4- $\text{ZTrpOC}_6\text{H}_4\text{OMe}-n$;
- 5- AcTyrOMe ; 6- AcTrpOMe ; 7- AcTrpOEt ;
- 8,9- AcPheOMe ; 10- $\text{BzTyrNHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$;
- 11- $\text{BzTyrNHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-m$; 12- $\text{BzTyrNHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-o$;
- 13- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$; 14- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-m$;
- 15- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{Cl}-m$; 16- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{Cl}-n$;
- 17- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{OMe}-m$; 18- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3-n$;
- 19- $\text{AcTyrNHC}_6\text{H}_4\text{OMe}-p$; 20- AcTyrGlyNH_2 ;
- 21- AcPheGlyNH_2 ; 22- AcPheNH_2 ;
- 23- AcTyrNH_2 ; 24- AcTyrNHCH_3

Рис. 63. Зависимость $\lg(k_{\text{cat}}/K'_m)$ от pK_a уходящей группы в реакциях химотрипсина со специфическими субстратами [1405]

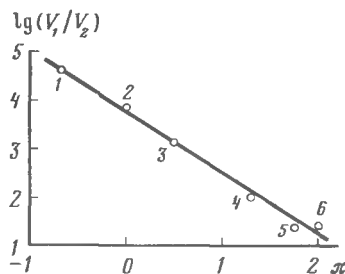
Изучение влияния структуры уходящей группы на химотрипсиновый катализ ([1405, с.388]) привело к выводу о том, что изменения pK_a этой группы сопровождаются изменением механизма реакции и стадии, определяющей скорость. Поэтому в широком интервале pK_a зависимость константы скорости от основности уходящей группы имеет сложный криволинейный характер (рис.63).

Вторичная специфичность и структура субстратов. Имеется очень немного публикаций, в которых количественно прослеживается связь структуры удаленных от расщепляемой группы остатков и скорости ферментативного катализа. На качественном уровне исследована зависимость скорости расщепления В-цепи инсулина, а также трипсиногена карбоксильной протеазой из *Aspergillus saitoi* [880].

Интересные данные были получены [2014] в отношении вторичной специфичности гидролиза химотрипсином эфиров и амидов трипептидов. Оказалось, что уменьшение гидрофобности остатка в положении P_2 увеличивает скорость гидролиза эфиров и уменьшает скорость гидролиза амидов (рис.64).

Рис.64. Зависимость относительных скоростей катализируемого химотрипсином гидролиза эфиров (V_1) и амидов (V_2) от гидрофобности боковой цепи в положении P_2 для соединений типа $RTyrOEt$ и $RTyrNH_2$ [2014]

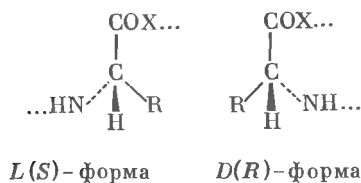
Заместитель (R): Ac (1), GlyGly (2), GlyAla (3), GlyVal (4), GlyLeu (5), GlyNle (6)



Было также исследовано влияние вторичной специфичности ацилдипептидов на связывание их химотрипсином и на положение равновесия в реакции ацилирования этими дипептидами фермента [2015]. Оказалось, что для серии соединений общей формулы $AsX-TyrOH$, где $X = Gly, Ala, Val, Leu$ и Phe , связывание химотрипсином ($-\Delta G_a$) линейно увеличивается при увеличении значения π для остатка X , тогда как положение равновесия реакции ацилирования не зависит от гидрофобности этого остатка.

4.3.3. Стереоспецифичность

подавляющее большинство амидгидролаз проявляет стереоспецифичность, т.е. катализирует гидролиз лишь одного энантиомера асимметрического субстрата $L(S)$ или $D(R)$:



Очевидно, что стереоспецифичность будет проявляться в том случае, когда субстрат взаимодействует с ферментом по крайней мере тремя группами, окружающими асимметрический атом [2016]. Слово "взаимодействие" здесь не обязательно означает связывание, но может означать наличие пространственных за-

трудностей для вхождения какой-либо группы в данный участок активного центра фермента.

Для протеаз можно различать первичную и вторичную стереоспецифичность в соответствии с влиянием на скорость гидролиза стереохимии аминокислотного остатка, образующего расщепляемую связь, и остатка, удаленного от этой связи.

Первичная стереоспецифичность большинства протеаз не проявляется в связывании субстрата. Так, значение K_i (K_m) комплексов α -химотрипсина с D -энантиомерами производных ациламинокислот даже несколько меньше, чем величины K_m для комплексов с L -энантиомерами (табл.47) [2017,2018]. Не сказывается на связывании также изменение конфигурации у остатков, удаленных от расщепляемой связи в пептидной цепи.

Таблица 47. Кинетические параметры химотрипсинового гидролиза n -нитрофениловых эфиров бензилоксикарбониламинокислот [2017]

Субстрат	π	$\frac{K_m(L)}{K_m(D)}$	$\frac{k_3(L)}{k_3(D)}$	$\frac{k_{cat}/K_m(L)}{k_{cat}/K_m(D)}$
ZAlaONp	0,5	2,41	33,8	14,1
ZButONp	1,0	0,9	76,8	83,8
ZNvIONp	1,5	0,84	54,7	64,6
ZLeuONp	2,42	1,98	75,5	38,1
ZPheONp	2,65	1,26	216	171

Изменение конфигурации α -C-атома у N -ациламинокислот влияет как на константу скорости деацилирования соответствующих ацилхимотрипсина, так и на константу скорости второго порядка (k_{cat}/K_m). В зависимости от характера уходящей группы влияние стереохимии субстрата может быть очень значительным (для амидов, метиловых эфиров) и относительно небольшим (для нитрофениловых эфиров) [2019].

Как видно из данных табл.47, увеличение гидрофобности боковой цепи субстрата в целом приводит к увеличению отношения констант L - и D -изомеров. Однако это отношение уменьшается при увеличении гидрофобности заместителя в N -ациламиногруппе (рис.65). Таким образом, D -энантиомеры ведут себя в отношении зависимости от характера заместителя прямо противоположным по сравнению с L -изомерами образом.

Очевидно, что эти соотношения являются следствием увеличения степени непродуктивного связывания при взаимодействии фермента с D -энантиомерами по сравнению с L -соединениями.

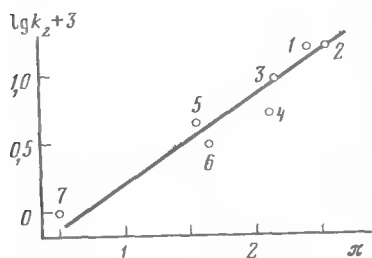
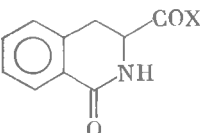
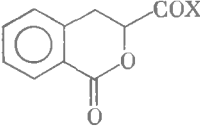
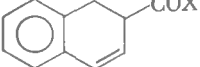
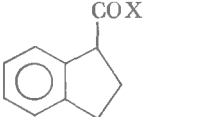
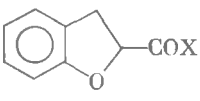


Рис.65. Зависимость констант скоростей ацилирования в реакциях химотрипсина с метиловыми эфирами N -ацилпроизводных D -аланина от гидрофобности N -концевой группы субстрата [1970]

Ацильные группы: тетрагидрофурил (1), тифенил (2), бензоил (3), o -аминобензоил (4), никотинил (5), изоникотинил (6), ацетил (7)

Таблица 48. Обращенная стереоспецифичность химотрипсина к субстратам с ограниченной конформационной подвижностью (pH 7,8)

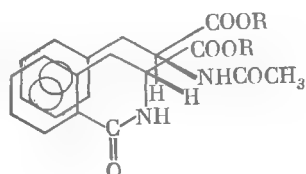
Номер	Соединение	Конфигурация	Замес- титель X^*	k_{cat}, c^{-1}	$K'_m \cdot 10^3, M$	Литературный источник
1		<i>D</i>	OMe	20,0	0,98	[2022]
		<i>L</i>	OMe	0,12	12,7	[2021]
		<i>D^{**}</i>	ONp	2,6	0,018	[1443]
2		<i>D</i>	OMe	56,0	2,5	[2022]
		<i>L</i>	OMe	1,8	28,0	[2021]
3		<i>S</i>	ONp	3,3	0,0045	[2023]
		<i>R</i>	ONp	0,072	0,0033	[2023]
4		<i>D</i>	OMe	0,006	11,2	[2024]
		<i>L</i>	OMe	0,002	52,3	[2024]
5		<i>D</i>	OMe	0,22	14,3	[2025]
		<i>L</i>	OMe	0,024	14,1	[2025]

* ONp – *n*-нитрофениловый эфир.
 ** pH 6,0.

Если изменить строение субстрата так, что конформация его *D*-формы будет отвечать требованиям продуктивного связывания, то можно получить субстраты с обращенной стереоспецифичностью. Так, многие субстраты с ограниченной конформационной подвижностью обладают значительно большей реакционной способностью в *D*-форме, чем в *L*-форме (табл.48) [2020,2021].

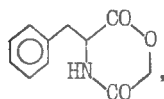
Инверсия стереоспецифичности соединения (1) (табл.48) обусловлена, как оказалось [2021,2022,2026], тем, что в своей экваториальной форме [2027] оно конформационно совпадает с эфиром *N*-ацетил-*L*-фенилаланина (рис.66).

Рис.66. Возможное взаимное расположение *D*-3-карбостоксидигидроизокарбостирила и эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина в активном центре α -химотрипсина [2029]



Аналогично ведет себя в отношении гидролиза этого соединения субтилизин [2028].

Результаты анализа конформации субстратов с ограниченной конформационной подвижностью, а также других типов "закрепленных" субстратов [1775], например



позволили составить представление о конформации типичных субстратов α -химотрипсина в активном центре фермента [2029].

Влияние вторичной стереоспецифичности на кинетические параметры ферментативного гидролиза обычно слабее, чем влияние первичной стереоспецифичности, и зависит от степени удаления остатка с *D*-конфигурацией от расщепляемой связи (табл.49). Следует отметить, что стереоспецифичность протеаз практически исчезает, если реакцию проводить в неводных растворителях [2032].

Таблица 49. Влияние *D*-конфигурации аминокислотного остатка, удаленного от расщепляемой связи, на кинетические параметры гидролиза

Фермент	Субстрат	$\frac{k_{cat}}{K_m}, M^{-1}c^{-1}$	$\frac{(k_{cat}/K_m)_L}{(k_{cat}/K_m)_D}$	Литературный источник
α -Химотрипсин	AcLeuTyrOMe	$2,9 \cdot 10^6$	152,6	[2030]
Трипсин	Ac-D-LeuTyrOMe	$1,9 \cdot 10^4$		
	BzPheValArgpNA	$2,96 \cdot 10^5$	3,14	[1808]
	Bz-D PheValArgpNA	$9,42 \cdot 10^4$		
	BocAlaLysOMe	$1,2 \cdot 10^6$	17,1	[1865]
	Boc-D-AlaLysOMe	$7 \cdot 10^4$		
Тромбин	BocAlaLysOMe	$4,2 \cdot 10^4$	751	[1865]
	Boc-D-AlaLysOMe	55,9		
Эластаза	AlaAlaPhe-AlaAlaAla	$3,6 \cdot 10^4$	3,27	[1871]
	D-AlaAlaPhe-AlaAlaAla	$1,1 \cdot 10^4$		
Субтилизин BPN'	ZAlaAlaLeuNH ₂	$1,14 \cdot 10^3$	82,9	[1846]
	Z-D-AlaAlaLeuNH ₂	13,75		
Папаин	AcPheGluPNA	$2,04 \cdot 10^3$	330	[2031]
	Ac-D-PheGluPNA	5,9		
Термолизин	ZGlyLeu-GlyAla	$3,08 \cdot 10^4$	16,5	[1888]
	ZGlyLeu-Gly-D-Ala	$1,86 \cdot 10^3$		
Пролидаза	ZGlyPro-Ala	$1,95 \cdot 10^5$	32	[1893]
	ZGlyPro-D-Ala	$6,08 \cdot 10^3$		

Протеазы специфичны не только к конфигурации асимметрического центра, но и к геометрии пептидной связи или двойной связи в субстрате. Так, было показано [1896,2033,2034], что пролидаза и другие пролинспецифичные ферменты способны расщеплять только *транс*-форму амидной связи.

Что касается химотрипсина и трипсина, то эти ферменты способны расщеплять субстраты, содержащие остатки *цис*-пролина в положениях P_2 и более удаленные от гидролизуемой связи, однако трипсин не гидролизует субстраты с *цис*-Про в положении P'_2 [2035,2036].

Было показано [2037, 2038], что *транс*-циннамоилхимотрипсин деацилируется со значительно более высокой скоростью, чем его *цис*-изомер. На этом основаны попытки использования этого фермента в бессеребряной фотографии [2039].

Следует отметить, что ряд ферментов не обладает выраженной стереоспецифичностью. Например, аспарагиназа II из дрожжей гидролизует как D-, так и L-аспарагин [658].

Конформационная специфичность. Чувствительность пептида к действию протеолитических ферментов может определяться его конформацией.

Для гидролиза нативных белков, конформационная подвижность которых невелика, этот тип специфичности может иметь определяющее значение. Если же субстрат конформационно подвижен и переход между конформациями (S_1 и S_2) определяется константой равновесия K



то скорость гидролиза одного из конформеров (например, S_2) будет

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s (1+K)/K + [S]_0}, \text{ где } [S]_0 = [S_2] + [S_1].$$

Таким образом, чем сильнее равновесие будет сдвинуто в сторону негидролизуемого конформера, тем выше будет значение K'_m , но наличие конформационного равновесия не будет влиять на величину k_{cat} .

4.3.4. Соотношения между каталитическими константами и константами Михаэлиса

Специфичность амидгидролаз может проявляться как в величине максимальной скорости ($V_{max} = k_{cat} [E]_0$), так и в связывании (K_s). Кроме того, возможно положение, когда в ряду субстратов увеличивается константа скорости одной из стадий (а также k_{cat}) и уменьшается наблюдаемая константа диссоциации фермент-субстратного комплекса (K_s), т.е. соблюдается принцип "лучшее связывание – лучший катализ" [1962]. Наконец, непродуктивное связывание может приводить к уменьшению как k_{cat} , так и K'_m ("лучшее связывание – худший катализ").

Анализ таких зависимостей для большого числа субстратов ряда протеаз показал [2040], что существует определенная взаимосвязь между значениями k_{cat} и K'_m , проявляющаяся особенно для однотипных субстратов (например, пептидов), имеющих сходную или одинаковую группировку, определяющую первичную специфичность фермента [1715]. Эта зависимость выражается в том, что для серии субстратов увеличение k_{cat} сопровождается лишь незначительным изменением K'_m до тех пор, пока значения k_{cat} не превысят некоторую, характерную для данного фермента, величину, после чего наблюдается тенденция к постоянству k_{cat} и уменьшению K'_m . Иными словами, наблюдается переход от проявления специфичности в максимальных скоростях к ее проявлению в связывании субстрата (рис. 67).

Такие соотношения k_{cat} и K'_m , по-видимому, сложились в ходе эволюции ферментов. Для обеспечения наибольшей скорости гидролиза субстрата при посто-

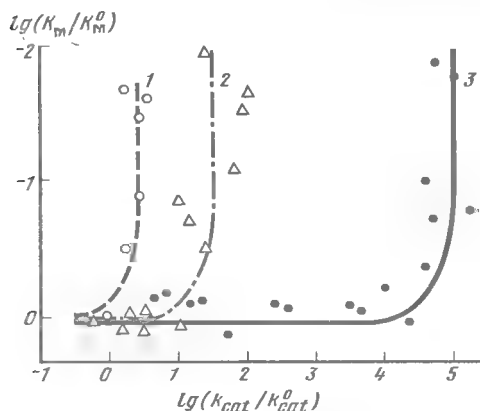


Рис. 67. Связь между относительными значениями K_m и относительными значениями k_{cat} в сериях субстратов карбоксипептидазы (1), химотрипсина (2) и пепсина (3) [2040]

Субстрат: 1- Ac-X-Phe [1738], 2- Ac-X-Phe-Y [1858, 1859], 3- Z-X-Phe(NO₂)-Phe-Y [1878, 1907]. X - аминокислотный остаток или пептид; Y - C-защитная группа или пептид

янном и максимальном значении k_{cat}/K'_m и постоянной концентрации субстрата выгодно иметь высокие значения K'_m (так, чтобы $K'_m > [S]_0$) [1613, с.304], и в этом случае наибольшая скорость будет достигаться увеличением k_{cat} . Однако эта величина, по-видимому, не может увеличиваться сверх определенного предела, зависящего как от структуры расщепляемой связи, так и от типа каталитического аппарата фермента. Поэтому дальнейшая максимизация скорости будет достигаться уменьшением K'_m , т.е. улучшением связывания субстрата. Более детально следствия наблюдаемых соотношений k_{cat} и K'_m , будут разобраны в гл.8.

Следует отметить, что сходные соотношения кинетических констант наблюдаются не только для гидролитических, но и для других типов ферментов [2041, с.72].

Соотношение "лучшее связывание - лучший катализ" выполняется для некоторых протеаз в серии субстратов, различающихся P₁-остатком. Так, для эфиров ациламинокислот была предложена [2042] линейная зависимость, связывающая величины k_2 и K_s в гидролизе химотрипсином:

$$\lg k_2 = C + \rho_a \sigma_x + \frac{\phi_a}{\phi_b} pK_s,$$

где C - константа, ρ_a и σ_x - параметры уравнения Гаммета, а ϕ_a и ϕ_b - величины чувствительности субстрата к изменению гидрофобности (π) на стадии ацилирования и связывания.

4.4. Эффективность

Если специфичность фермента выявляется при сравнении скоростей превращения в серии субстратов, то, чтобы оценить его эффективность, необходимо сравнить скорость превращения субстрата, катализируемого ферментом, со скоростью в модельной, неферментативной реакции. Здесь возникает несколько проблем.

Во-первых, это проблема выбора модельной реакции. Косовер [2043] ввел представление о конгруэнтной модельной реакции, т.е. такой неферментативной реакции, которая идет через те же самые или очень сходные промежуточные со-

единения, что и ферментативная реакция. Таким образом, выбор конгруэнтной модели подразумевает знание механизма как ферментативной, так и модельной реакции. На современном уровне наших знаний это не всегда можно сделать однозначно. Для гидролитических реакций, катализируемых четырьмя известными группами амидгидролаз, наиболее близкими конгруэнтными моделями, очевидно, являются реакции, катализируемые низкомолекулярными веществами, природа которых сходна с природой каталитически активных групп фермента, т.е. ионами $R-S^-$ и $R-O^-$, карбоксилат-ионом и ионом металла. Однако и здесь возникают проблемы, связанные, например, с концентрацией каталитически активной формы нуклеофила в ферменте.

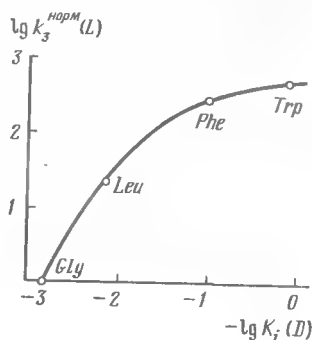
Во-вторых, это проблема выбора сравниваемого кинетического параметра. Модельные и ферментативные реакции различаются молекулярностью. Первые — обычно реакции второго порядка, тогда как скорость ферментативного процесса зависит только от концентрации фермент-субстратного комплекса. Очевидно, что сравнивать лучше всего константы одинакового порядка, например константу скорости второго порядка модельной реакции (k_{OH} , k_{SH} и т.д.) и константу скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) ферментативной реакции. В то же время представляет интерес сравнение величины константы скорости второго порядка для модельной реакции и k_{cat} фермента. Такое сравнение дает величину эффективной концентрации субстрата, при которой скорость его превращения в продукт равна скорости ферментативной реакции.

Следует помнить, что величины k_{cat}/K_m , k_{cat} и K_m могут быть эффективными величинами, не характеризующими скорость или равновесие на какой-либо стадии процесса, а являющиеся комбинацией констант скоростей отдельных стадий (см. разд.4.1.3). Кроме того, и константа скорости модельной реакции может быть эффективной величиной, если существует равновесие нескольких различающихся по реакционной способности форм субстрата. Эта проблема будет подробно рассмотрена в гл.8.

Наконец, трудным вопросом при определении эффективности ферментативного катализа является выбор субстрата. Скорость модельных реакций мало зависит от структуры субстрата (для одинаковых расщепляемых связей), тогда как скорость ферментативной реакции может меняться на 5–7 порядков при изменении структуры даже удаленных от расщепляемой группы участков молекулы.

Что касается протеолитических ферментов, поскольку их природными субстратами являются часто белки, то для определения эффективности следовало бы выбирать именно эти субстраты. Однако очень трудно определить скорость гидролиза одной амидной связи в таком биополимере не только в неферментативной, но и в ферментативной реакции. В табл.42 приведено несколько примеров таких реакций. Во многих случаях скорости гидролиза белков не очень велики.

Рис.68. Зависимость нормализованных констант скорости деацилирования ацилхимотрипсина от величин сродства к ферменту соответствующих амидов N-ацетил-D-аминокислот [3405]



Обширный экспериментальный материал имеется по гидролизу синтетических пептидов. Определение эффективности на основе этих данных наиболее правильно при "насыщении специфичности", т.е. при использовании субстратов, максимально быстро превращающихся данным ферментом. Следует учитывать, что в каждом ряду субстратов может быть свой уровень "насыщения". Например, скорости деацилирования ацилхимотрипсина стремятся к пределу в ряду ацильных остатков с увеличивающейся гидрофобностью боковой цепи, достигая максимального значения в случае N-ацетилтриптофанилхимотрипсина (рис.68).

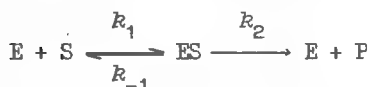
Сравнение скоростей катализируемых амидгидролазами реакций гидролиза со скоростями соответствующих модельных реакций показывает, что эффективность этих ферментов составляет 10^7-10^{12} (табл.50).

Возникает вопрос, какова может быть предельная скорость реакции при ферментативном гидролизе? Очевидно, что в простейшем случае двухстадийного ферментативного процесса

Таблица 50. Эффективность некоторых амидгидролаз

Фермент	Субстрат	k_{cat}, c^{-1}	$K_m \cdot 10^3, M$	$k_{cat}/K_m, M^{-1}c^{-1}$	$\frac{k_{cat}^*}{K_m k_n}$	Литературный источник
Химотрипсин	FaTrpOMe	27,1	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^9$	[2044]
	AcTrpONp	30,5	$2 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^6$	[1761]
	AcProAlaProPhe-PheNH ₂	8,0	0,21	$3,8 \cdot 10^4$	$1,15 \cdot 10^8$	[1841]
Субтилизин Карлсберг	AcGlyGlyPhe(NO ₂)OMe	$1,35 \cdot 10^5$	48,5	$2,8 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^7$	[2045]
Термомикололин	Ac(Ala) ₃ OMe	$2,05 \cdot 10^3$	1,5	$1,36 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^7$	[381]
Папаин	ZGlyValGlu-Leu-Gly	8,9	2,9	$3,1 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^{12}$	[1819]
Пепсин	ZAlaAlaPhe-PheOpp	282	0,04	$7 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^{11}$	[1878]
Co ²⁺ -карбоксипептидаза А	ZGlyGly-Phe	283	0,3	$9,4 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^{10}$	[1738]
Карбоксипептидаза В (человека)	BzAla-Arg	426	0,086	$4,9 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^{11}$	[2046]
β -Лактамаза	Бензилпенициллин	2000	0,02	$1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9$	[1856]
Ренин	Ангиотензиноген	50	0,001	$5 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^{12}$	[923]

*Константы скорости неферментативного гидролиза ($k_n, M^{-1}c^{-1}$) приведены в табл. 26 и 29, а также в работах [1533,1570].



общая скорость реакции будет определяться значениями k_1 и k_2 и не может быть выше, чем одна из них. При увеличении константы k_2 величина $k_{cat}/K_m = k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)$ будет стремиться к k_1 и достигать этого значения при $k_2 \gg k_{-1}$ [2047]. Таким образом, k_{cat}/K_m не может быть выше, чем k_1 . В свою очередь значение k_1 лимитируется скоростью диффузии и для белок-лигандных взаимодействий не превышает величины $1 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [1733]. Отсюда следует, что и константа скорости второго порядка не может быть выше этого значения.

Как видно из табл.42 и 50, для некоторых катализируемых амидгидролазами реакций скорость приближается к диффузионно контролируруемому лимиту. Были получены [2048,2049] прямые подтверждения тому, что скорость ферментативной реакции может контролироваться диффузией. Изучение [2048] зависимости величин k_{cat}/K_m для гидролиза бензилпенициллина ($2,35 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$) и цефалоридина ($1 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$), катализируемого β -лактамазой от вязкости среды показало, что увеличение вязкости (т.е. снижение скорости диффузии) влияет на гидролиз быстро гидролизуемого субстрата и не влияет на медленный субстрат. Прямое определение k_1 для этих субстратов дало значение порядка $1,7 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

4.5. Сравнение эффективности и специфичности амидгидролаз

Эффективность амидгидролаз превосходит эффективность соответствующих модельных катализаторов в 10^7 - 10^{12} раз. Сериновые протеазы тяготеют к нижнему пределу этого интервала, тогда как аспартатные и металлсодержащие - к верхнему пределу. Несмотря на относительно невысокое значение k_{cat}/K_m для папаина - представителя цистеиновых протеаз, его эффективность одна из самых высоких за счет низкого значения каталитической эффективности тиолов в гидролизе амидов. Интересно отметить, что эффективность сериновых протеаз в общем мало зависит от типа расщепляемой связи.

Отклонение, наблюдаемое для *n*-нитрофенилового эфира ацетилтриптофана, обусловлено общей для этого соединения и соответствующего метилового эфира лимитирующей стадией деацилирования ацилхимотрипсина. Для этой стадии ферментативного гидролиза расщепление *n*-нитрофениловых эфиров не является адекватной модельной реакцией.

Эффективность β -лактамазы находится в интервале эффективности других протеаз, хотя модельные β -лактамы гидролизуются в неферментативных условиях примерно в 100 раз быстрее, чем обычные амиды.

Сравнение эффективности различных амидгидролаз имеет, однако, относительную ценность, поскольку нет уверенности в том, что рассматриваемые сейчас субстраты являются наилучшими, а конгруэнтные модели действительно конгруэнтны. Важно отметить лишь, что амидгидролазы относятся к числу весьма эффективных ферментов, причем не исключено, что их эффективность определяется стадиями ассоциации и диссоциации соответствующих комплексов с субст-

ратами или продуктами. Для сравнения отметим, что, например, каталаза, обычно рассматриваемая как пример одного из самых эффективных ферментов ($k_{cat}/K_m = 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [2050]), лишь в $5 \cdot 10^3$ эффективнее модельного катализатора — гематина [2051].

На кривых распределения значений k_{cat} , k_{cat}/K_m и k_1 , полученных для большого числа ферментов [2041, с.70], данные для хороших субстратов амид-гидролаз укладываются вблизи максимумов (рис.69).

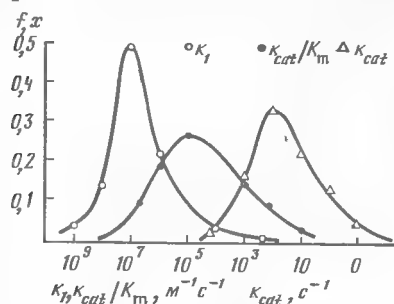


Рис.69. Плотности функции распределения $[f(x)]$ констант скоростей лимитирующих стадий ферментативных реакций (k_{cat}), констант скоростей образования фермент-субстратных комплексов (k_1) и констант скоростей 2-го порядка (k_{cat}/K_m) [2041]

Оценить относительную специфичность различных ферментов можно, сравнивая вероятности расщепления амидных связей в белках и пептидах [1956], т.е. отношение числа расщепляемых связей к общему числу связей в изученных последовательностях. Среди исследованных таким образом ферментов химотрипсин и пепсин относятся к наиболее специфичным:

Фермент	Вероятность	Фермент	Вероятность
Химотрипсин	0,14	Эластаза	0,24
Пепсин	0,15	Папаин	0,26
Термоллизин	0,18		

Однако к таким оценкам следует подходить с осторожностью, поскольку они не учитывают разную частоту встречаемости той или иной аминокислоты в последовательности белков.

Как уже отмечалось в разд.4.3.1.4, разные протеазы существенно отличаются по отношению к влиянию вторичных взаимодействий на катализ. Это относится не только к ферментам разных групп, но и к протеазам, входящим в одну и ту же группу, например химотрипсину и субтилизину BPN' или эластазе. С этой точки зрения последние два фермента более специфичны, чем химотрипсин, что противоречит приведенным выше данным [1956].

К сожалению, пока еще нет возможности сравнивать специфичность различных амидгидролаз безотносительно к выбранной серии субстратов, на основе критериев, изложенных в разд.4.3. Имеется большое число публикаций, в которых сравниваются скорости гидролиза одного и того же или нескольких близких субстратов различными ферментами, принадлежащими к родственным типам (см., например: [419,772,1827,1833,1847,1848,1863,1868,1904,2052–2059]). Однако в целом оценка специфичности остается все еще довольно интуитивной.

4.6. Влияние модификации амидгидролаз на их активность

Модификация ферментов может приводить к существенным изменениям их эффективности и специфичности. Это часто позволяет составить представление о роли тех или иных участков молекулы фермента в проявлении им каталитических свойств. Можно различать три типа модификаций: 1) протеолитическая модификация, т.е. отщепление (или присоединение) определенного фрагмента полипептидной цепи; 2) химическая модификация – введение в белок чужеродных фрагментов и группировок и 3) направленный мутагенез – замена одних остатков аминокислот на другие. Последний тип модификаций стал возможен в последнее время в связи с развитием техники рекомбинантных молекул и, несомненно, имеет большое будущее в отношении исследований связи структуры и активности ферментов.

4.6.1. Протеолитическая модификация

Следует, во-первых, рассмотреть те модификации, которые встречаются в природе, т.е. зимогены, различные формы активных ферментов, возникающие за счет неоднозначной активации или действия посторонних протеиназ.

Оказалось, что зимогены некоторых сериновых протеаз – химотрипсиноген и трипсиноген обладают заметной каталитической активностью [2060–2063] (табл.51).

Таблица 51. Активность зимогенов [2061] и соответствующих сериновых протеаз

Белок	BocGlyONp*			ZSerGlyGlyONp*		
	$k_{cat},$ с ⁻¹	$K_m \cdot 10^3,$ М	$k_{cat}/K_m,$ М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{cat},$ с ⁻¹	$K_m \cdot 10^3,$ М	$k_{cat}/K_m,$ М ⁻¹ с ⁻¹
Химотрипсиноген	0,0077	2,7	2,85	0,0037	7,1	0,52
Химотрипсин	1,2	1,3	923	0,32	0,47	680
Трипсиноген	0,0036	3,4	1,05	0,004	6,3	0,63
Трипсин	1,2	1,45	827	0,47	5,8	81

*n-Нитрофениловые эфиры.

Как видно, различие в активности составляет 3–4 порядка, причем главным образом за счет снижения каталитической константы. Было показано [2062], что увеличение ионной силы раствора приводит к увеличению активности трипсиногена за счет уменьшения величины K_m .

Были также обнаружены активные формы пепсиногена, образующиеся в процессе его активации при смещении pH из нейтральной в кислую область [2064, 2065].

Как отмечалось ранее, активация зимогенов часто происходит неоднозначно, причем образуются разные формы ферментов, отличающиеся структурой N-концевой части молекулы или числом и структурой полипептидных цепей. Было отмечено, что разные формы активных протеаз могут отличаться по своим кинети-

ческим характеристикам [292,2066]. Формы химотрипсина с различным образом расщепленной С-цепью (δ -химотрипсин, α_1 -химотрипсин) отличаются от α -химотрипсина величиной K_m по отношению к сложноэфирным субстратам в щелочной области [2066]. Было показано также [1207], что формы α -, β - и γ -трипсина заметно различаются по кинетическим параметрам в отношении одного и того же субстрата.

Аналогичная картина наблюдается для тромбина. Активация протромбина фактором Va (в присутствии Ca^{2+} и фосфолипида) приводит к α -тромбину, который может подвергаться автолизу с образованием β - и γ -тромбинов. Кроме того, могут образовываться другие формы - ϵ , β_T и др. Все они определенным образом отличаются по своим каталитическим свойствам [2067]. Было показано [2068], что β -цепь α -тромбина, будучи выделена в особых условиях, сохраняет до 5% каталитической активности.

Весьма сложным является процесс активации ренина. Проренин - неактивный белок с $M_r \approx 43$ кДа быстро активируется с расщеплением связи Arg63-Ser64, образуя одноцепочечный активный фермент. Последний способен медленно превращаться в двухцепочечную форму с $M_r \approx 36,5$ кДа путем выселения остатков 355-356 [2069].

Двухцепочечный фермент энтеропептидаза при восстановлении дисульфидной связи образует каталитически активную легкую цепь, обладающую трипсиноподобной специфичностью по активации трипсиногена. Однако активация в этом случае идет много медленнее и только при высоких значениях pH. Интересно, что соевый трипсиновый ингибитор, не способный подавлять нативную энтеропептидазу, эффективно реагирует с легкой цепью [2070]. Отмечалось также протеолитическое расщепление энкефалиназы [2071], калпаинов [2072] и плазмина (образование "микроплазмина" [2073,2074]), мало влияющее на свойства ферментов.

Интересным примером является действие субтилизина на термолизин [2075]. При этом отщепляется N-концевой тетрапептид и происходит расщепление по связи Thr224-Gln225. Образовавшиеся две цепи с M_r 24 и 10 кДа очень прочно ассоциированы. Такой термолизин S (по аналогии с РНКазой S) сохраняет 3% активности нативного фермента.

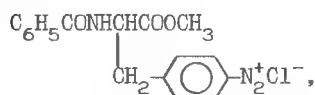
4.6.2. Химическая модификация

Существует очень большое число работ по химической модификации ферментов, в том числе и амидгидролаз (см. обзоры: [163,2076-2080]).

Химическая модификация амидгидролаз обычно приводит к падению их каталитической активности за счет увеличения K'_m или уменьшения k_{cat} . Однако некоторые модификации не приводят к снижению связывающих субстрат свойств фермента. Так, метилирование каталитически важного остатка His57 в химотрипсине [1324] не влияет на способность связывать субстраты и ингибиторы [1325, 1326,2081,2082]. Каталитическая активность (His57)-метилхимотрипсина, хотя и уменьшается примерно на пять порядков, все же сохраняется [1325]. Связывание субстратов сохраняется и в ангидахимотрипсине. В некоторых цистеиновых протеазах удается заменить тиоловую группу в остатке цистеина активного центра на гидроксильную группу и в сериновых - гидроксил серина на тиоловую группу, получая искусственные ферменты [2083]. Оказалось, что тиол-

субтилизин гидролизует *n*-нитрофениловые эфиры с более высоким значением k_{cat}/K_m , чем исходный субтилизин [2084]. Удалось получить также селенолсубтилизин [2085]. Этот искусственный фермент более, чем на четыре порядка активнее в отношении ацилтрансферазных реакций, чем субтилизин.

Нередко химическая модификация изменяет соотношение между пептидазной и эстеразной активностью ферментов. Так, азосочетание α -химотрипсина с диазо-аналогом субстрата



происходящее по остатку Tyr146, приводит к значительному увеличению амидазной активности (по SucGly₃PheNA) по сравнению с эстеразной (по AcTyrOEt) – соотношение констант скорости второго порядка для эфира и амида меняется с 300 у немодифицированного фермента до 50 – у модифицированного [2086].

Противоположные изменения наблюдаются [2087] при азосочетании (с диазо-1Н-тетразолом) и нитровании (тетранитрометаном) карбоксипептидазы А. Диазосочетание проходит по остатку Tyr248 и приводит к увеличению эстеразной и к небольшому падению амидазной активности, а последующее нитрование остатка Tyr198 не влияет на эстеразную активность, но существенно снижает амидазную.

Отмечалось также увеличение амидазной активности карбоксипептидазы А и термолизина [2088] при химической модификации, однако специфическая модификация Tyr248 в карбоксипептидазе А приводит к полной потере амидазной при сохранении эстеразной активности [1260].

Изменение специфичности трипсина наблюдалось [2090] при этилировании фермента триэтилоксонийфторборатом. Полученное производное теряло способность гидролизовать катионные субстраты и связывать специфические ингибиторы, но сохраняло и даже увеличивало способность связывать и гидролизовать нейтральные субстраты. Гидрофобизация химотрипсина увеличивает значение k_2 в 2,3 раза [2091].

Модификация может быть направлена на изменение устойчивости и растворимости фермента в органических растворителях. Так, модификация поверхностных аминок групп химотрипсина и трипсина поликарбоновыми кислотами значительно увеличивает их стабильность к тепловой денатурации [2092], а введение в молекулу химотрипсина эфиров полиэтиленгликоля позволяет получить препараты, растворимые в трихлорэтано [2079].

В случае металлсодержащих амидгидролаз значительный интерес представляют изменения кинетических параметров в зависимости от характера металла, присутствующего в активном центре. Ион Zn^{2+} в карбоксипептидазе А может быть заменен на ион Co^{2+} [2093]. При этом наблюдается значительная активация фермента: значение k_{cat}/K_m для гидролиза ZGlyGlyPhe возрастает с $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ для Zn^{2+} -фермента до $9,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (за счет k_{cat}) [1738]. Аналогичная активация наблюдалась для аминокпептидазы из *Bacillus subtilis* [2094] и *Aeromonas* sp. [2095].

Обычно углеводы, входящие в состав амидгидролаз, не оказывают какого-ли-

бо эффекта на их специфичность или каталитические свойства. Однако имеются исключения из этого правила. Так, различные дрожжевые карбоксипептидазы Y, отличающиеся по углеводному составу, имеют разные кинетические характеристики [2096].

Было отмечено [1917, 2097–2099], что гликозилирование многих белков происходит в местах β -изгибов полипептидной цепи. Именно эти участки являются наиболее уязвимыми в реакциях ограниченного протеклиза. Вероятно, поэтому гликозилирование защищает белки от неспецифического расщепления протеазами. Это представление получило некоторое экспериментальное подтверждение [2100].

Следует также отметить различия в специфичности, наблюдающиеся у разных форм субъединичных амидгидролаз. Аминопептидаза из *Bacillus stearothermophilus* API состоит из двенадцати субъединиц α и β , входящих в различные формы фермента в разном соотношении. Гидролиз пептидов, содержащих остатки Asp и Glu, происходит лишь полными формами фермента, тогда как изолированные α - и β -субъединицы гидролизуют нейтральные пептиды [1011].

4.6.3. Направленный мутагенез

Известен ряд примеров различной активности природных мутантных форм некоторых амидгидролаз [1195, 2101–2103]. В случае точечных мутаций появляется возможность сравнивать свойства ферментов, в которых произошла замена одной аминокислоты на другую. Однако эти возможности были весьма ограничены, пока не была разработана техника направленного мутагенеза (см. обзоры: [2104, 2105]). С тех пор работы по направленному мутагенезу ферментов стали нарастать лавинообразно (см.: [2106–2110]). Это направление получило название белковой инженерии ферментов и успешно используется для выявления связи их структуры и функции.

Наиболее широко этот метод был использован для исследования субтилизина с целью получения фермента, устойчивого к окислению [2111] и к тепловой денатурации [2112–2115], для изменения pH-оптимума фермента [2116], выяснения роли отдельных остатков в области активного центра в специфичности фермента [2117–2121] и, наконец, для подтверждения механизма стабилизации переходного состояния [2122].

Окисление Met222 приводит к значительному снижению активности субтилизина. Была произведена замена этого остатка на 19 других аминокислот. Оказалось, что замена на нейтральные аминокислоты лишь немного сказывается на активности, тогда как введение заряженных остатков снижает активность в 200–300 раз. Ферменты, содержащие вместо Met222 остатки других нейтральных аминокислот, устойчивы к окислению. Были предприняты попытки увеличить термостабильность субтилизина введением одной или двух дисульфидных связей в положения 22–87 или 24–87; как оказалось, это не приводит к увеличению термо- и автолитической стабильности [2112]. Образовавшаяся S–S-связь лежит на поверхности и имеет необычную напряженную конформацию [2113]. Обширные исследования различных типов S–S-содержащих субтилизинов не выявили связи между наличием и положением дисульфидных мостиков и устойчивостью фермента [2115].

Замены в субтилизине BPN' остатков Asp99 на Ser или Glu156 на Ser и др.

приводят к сдвигу pK_a His64 от +0,08 до -1,0 единицы [2116]. Замена Asn155 → Leu, не влияя на K_m , снижает активность более, чем в 200 раз. Авторы [2122] рассматривают этот факт, как подтверждение гипотезы стабилизации ферментом переходного состояния субстрата (см. гл.7 и 8).

Весьма подробно была исследована роль остатков в связывающей субстрат полости субтилизинов BPN' и *Bacillus licheniformis* в проявлении ими субстратной специфичности. Были произведены замены остатков в положениях 166, 156, 169 и 217. Остаток Gly166 заменялся на остатки различной гидрофобности, в результате чего были получены мутантные субтилизины с измененной специфичностью. Так, введение в положение 166 остатка Ile увеличивает более, чем на порядок, значение k_{cat}/K_m для субстратов, содержащих Ala в положении P_1 , и снижает почти на три порядка это значение для субстратов с Phe и Tyr [2109]. Замена сразу трех остатков Glu156, Gly169 и Tyr217 в субтилизине BPN' на остатки, свойственные ферменту из *Bacillus licheniformis* (Ser156, Ala169 и Leu217), дает мутант со специфичностью, близкой последнему ферменту [2120]. Наконец, замена в области связывания иона Ca^{2+} Pro172 и Gly131 на остатки Asp увеличивает связывание этого иона в 6 раз [2121].

Довольно обширные замены были проведены в трипсине крыс [2119, 2123-2126]. Так, замена остатков Gly216 и Gly226 на Ala приводит к изменению предпочтительности фермента по отношению к Arg- и Lys-содержащим субстратам [2123, 2124]. Снижение при этом каталитической активности, по-видимому, обусловлено деформацией оксианионной полости фермента [2124]. Была также произведена замена субстратсвязывающего остатка Asp189 на остаток Lys. Фермент при этом теряет способность связывать и превращать субстраты с Lys или Arg в P_1 , но приобретает слабую химотрипсиновую активность. Боковая цепь остатка Lys189 в мутантном ферменте, по-видимому, направлена вне связывающей субстрат полости [2126].

Мутация зимогена аспартатной протеиназы прохимозина [2127] в области участка процессинга (27-31) позволила установить, что этот фермент и, по-видимому, другие аспартатные протеиназы могут образовываться путем расщепления сразу по связи Phe42-Gly, а не обязательно через стадию отщепления пептида 1-27 (см. гл.5). Для другой аспартатной протеиназы - ренина замена Ala317 на Asp привела к сдвигу pH-оптимума на 0,5 единицы в кислую область [2128], что частично подтверждает роль этого остатка в проявлении ренином, в отличие от других аспартатных протеиназ, нейтрального pH-оптимума.

Имеются данные о направленном мутагенезе нейтральной эндопептидазы (3.4.24.11) [2129], вирусных протеиназ [2130, 2131] и β -лактамаз [2132-2134]. Так, заменой Ser70 в β -лактамазе (RTFM) на Cys была получена тиол- β -лактамаза, сохранившая частично активность по гидролизу бензилпенициллина и чувствительная к *n*-хлормеркурийбензоату - типичному ингибитору цистеиновых амидгидролаз.

Наконец, следует упомянуть весьма неожиданный результат замены остатка Tyr248 в карбоксипептидазе А на остаток фенилаланина [2135]. Такая мутация не изменила k_{cat} и лишь несколько увеличила значение K_m . Поскольку фенольному гидроксилу остатка Tyr248 весьма основательно приписывалась роль общего кислотного катализатора в катализе этим ферментом (см. гл.7), такой результат заставляет пересмотреть сложившееся мнение.

4.7. Синтетическая активность амидгидролаз

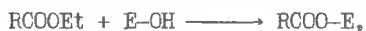
Поскольку при нейтральных значениях pH константа равновесия реакции



близка к единице (см. разд.3.1), при достаточных концентрациях реагентов протеолитические ферменты могут катализировать синтез амидной связи. Впервые такая возможность была продемонстрирована в 1937 г. [2136]. В последующие годы интерес к препаративному ферментному синтезу пептидов значительно возрос в связи с возможностями препаративного получения некоторых ценных пептидов и белков (см. обзор: [2137]).

В качестве катализаторов используются α -химотрипсин [2138-2141], фицин [2142], термолизин [2141,2143-2145], карбоксипептидаза Y [2146,2147], микробные металлопротеиназы [588] и другие ферменты. Довольно хорошие результаты дает использование иммобилизованных ферментов [2148,2149], а также применение модифицированных ферментов, обладающих пониженной амидазной активностью, но сохраняющих эстеразную. К последним относятся тиолсубтилизин [2150] и N^E-метил(His57)-химотрипсин [2151].

Специфичность ферментов в реакциях синтеза хорошо согласуется с их специфичностью в гидролитических реакциях [2139,2152]. То же самое относится к pH-зависимости пептидного синтеза [2151]. При использовании в качестве катализатора сериновых протеаз, они с эфиром быстро образуют ацилфермент и затем ацильная группа переносится на амин:



Была подробно исследована кинетика реакции синтеза в таких условиях и предложены способы определения максимального выхода [2140,2143,2152,2153].

Основной вклад в изменение стандартной свободной энергии обратимой реакции синтеза-гидролиза амидной связи вносит ионизация продуктов гидролиза. Поэтому выгодно проводить синтез в условиях, когда оба реагента не ионизированы. Однако в обычных условиях этого достичь нельзя. Были предложены остроумные методы обхода этой трудности. Так, реакцию синтеза можно проводить, используя эфир ациламиноокислоты и аминокомпоненту при pH~10, когда последняя не ионизирована.

Другой способ подавить ионизацию реагентов – это проводить реакцию синтеза в водно-органическом растворителе. При этом можно добиться очень значительного изменения константы равновесия [1424,2145,2154-2158]. Этим способом удается синтезировать не только пептиды, но и эфиры ациламиноокислот [1424], равновесие для которых в водной среде сильно сдвинуто в сторону гидролиза. Следует отметить, что субтилизин сохраняет свою каталитическую активность в безводном диметилформамиде. Реакция в этом растворителе между эфирами карбоновых и ациламиноокислот и углеводами позволила получить ацил-моносахариды с высокими выходами [2159]. Удачным для сегментного синтеза пептидов, оказывается замена части воды, добавляемой в органический растворитель, этиленгликолем, формамидом и пр. [2160].

Методы пептидного синтеза с помощью протеаз были с успехом использованы для получения биологически важных пептидов – энкефалинов [2161], ангиотензина II [2162], секретина [2163], а также для модификации белков – соевого трипсинного ингибитора [2164] и рибонуклеазы А [2165].

Особенно впечатляющим является получение инсулина человека из свиного инсулина с помощью протеазы I из *Achromobacter* [588,2166]. Этот фермент селективно отщепляет остаток Ala30 в В-цепи инсулина. Обработка такого дез-(Ala30)-инсулина избытком *трет*-бутилового эфира треонина в присутствии того же фермента и органического растворителя привела после удаления *трет*-бутильной группы к инсулину человека с выходом 85%.

4.8. Побочные и необычные реакции, катализируемые амидгидролазами

Многие амидгидролазы катализируют не только реакции гидролиза и синтеза амидной связи, но и другие реакции, из которых наиболее интересной является реакция транспептидации.

4.8.1. Транспептидация

Известны два типа таких реакций: транспептидация по типу ацильного переноса [2167]



и транспептидация по типу аминопереноса [2168]



В этих реакциях исходный амид обычно называют донором транспептидации, а соединение, на которое происходит перенос фрагмента донора, – акцептором транспептидации. Акцептором может служить один из продуктов гидролиза субстрата (донора), например [2169]:



Реакция ацильной транспептидации катализируется многими сериновыми и цистеиновыми протеазами [2170–2172]. Имеется единственное сообщение [2173] о том, что α -химотрипсин способен катализировать также реакцию аминопереноса



Аспартатные протеазы катализируют в основном реакции аминопереноса [2174–2176], однако, если донором служит соединение со свободной аминогруппой, то наблюдается также и ацильная транспептидация [2169,2177,2178]. Аминоперенос, катализируемый пепсином, идет преимущественно с донорами, содержащими свободную карбоксильную группу у переносимого остатка. Долгое время считалось [2176], что пепсин вообще не способен катализировать перенос за-

щипленного по карбоксильной группе остатка, но в дальнейшем выяснилось [1667], что низкие выходы в этой реакции по сравнению с переносом свободной аминокислоты обусловлены меньшим отношением скоростей транспептидации и гидролиза в последнем случае (табл.52).

Таблица 52. Кинетические параметры реакции транспептидации, катализируемой пепсином (рН 4,6; 37°C); акцептор ZPhe(NO₂)OH [1667]

Донор	$k_5 \cdot 10^2$, мин ⁻¹	K'_T , мм*	$\frac{k_5(1,3)}{k_5(2,4)}$	$\frac{k_5}{k_{cat}}$
1. AcPheTyr	3,1	0,156	1,06	0,019
2. AcTyrTyr	2,93	0,424		0,046
3. AcPhePheApm**	4,65	1,7	0,95	$7,6 \cdot 10^{-3}$
4. GlyGlyPhePheApm	4,89	0,17		$8,6 \cdot 10^{-4}$

* $K'_T = (k_{-4} + k_5)k_3 / k_2k_4$ (см. схему 13).
 ** Apm - 3-(морфолино)пропиламид.

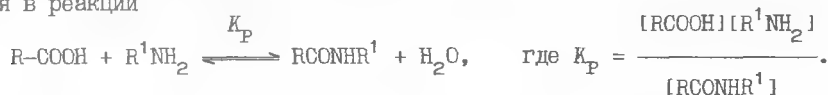
Металлсодержащие эндопептидазы типа термолизина катализируют как amino-, так и ацильную транспептидацию [2173], а аминопептидаза (лейцинаминопептидаза) - ацильный перенос [2179].

Для карбоксипептидаз до сих пор не обнаружена способность катализировать реакции транспептидации. Исключение составляют D-аланинкарбоксипептидазы [256,2180,2181], катализирующие реакции типа

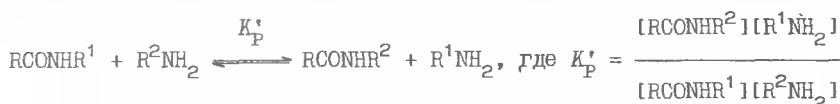


Важнейшее феноменологическое отличие транспептидации от реакции синтеза пептида заключается в том, что транспептидация всегда идет только в присутствии субстрата, тогда как ресинтез пептида может происходить при наличии в системе только продуктов гидролиза пептида и катализатора.

Выходы продуктов транспептидации существенно выше равновесных выходов продуктов синтеза, если реакции проводить при низких концентрациях реагентов. Действительно, выход продукта синтеза определяется константой равновесия в реакции



В равновесии при $K_P \approx 1$ и $[RCONHR^1] = [R^1NH_2] = 0,01$ М концентрация пептида составит 0,0001 М, т.е. выход будет 1%. В реакциях транспептидации при концентрациях донора и акцептора 0,01 М выход продукта транспептидации может достигать 100%. Это понятно, так как для реакции



константа равновесия (K'_p) всегда будет близка к единице, а равновесная концентрация продукта

$$[RCONHR^2] = \sqrt{[RCONHR^1][R^2NH_2]K'_p}$$

при равных концентрациях субстрата и акцептора будет равна концентрации исходных веществ. На самом деле выходы транспептидации существенно ниже из-за параллельно протекающих процессов гидролиза как субстрата, так и продуктов переноса.

Специфичность ферментов в реакциях транспептидации целиком аналогична их специфичности в реакциях гидролиза [2182]. Любая модификация фермента, снижающая активность в отношении гидролиза, пропорционально понижает их активность в реакциях транспептидации. Очевидно, что катализ в обоих случаях обусловлен функционированием одних и тех же групп активного центра.

Использование хромогенного акцептора позволило [1667] измерять начальные скорости реакции транспептидации по типу аминопереноса. Было показано (см. табл.52), что константа скорости транспептидации [кинетическая схема (13), разд.4.111] одинакова для разных доноров, содержащих одну и ту же переносимую группу (при одном и том же акцепторе). Это означает, что перенос осуществляется из общего для разных доноров комплекса.

4.8.2. Обмен кислорода в карбоксильной группе

АЦИЛАМИНОКИСЛОТЫ

Если инкубировать ациламинокислоту с амидгидролазами типа пепсина, химотрипсина, карбоксипептидазы и др. в тяжелоокислородной воде ($H_2^{18}O$), то наблюдается довольно быстрый обмен кислорода в карбоксильной группе субстрата [2183,2184]:



Специфичность ферментов в этой реакции также аналогична той, которая наблюдается по отношению к акцепторам транспептидации и к ингибированию гидролитических реакций продуктами [2185].

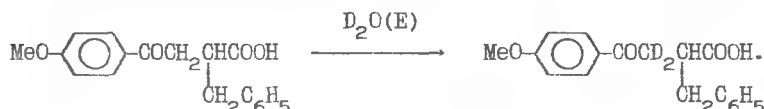
Константы скорости изотопного обмена обычно близки константам скорости гидролиза субстратов, содержащих ту же ациламинокислоту. Так, скорость кислородного обмена в ацетилфенилаланине, катализируемом пепсином, характеризуется константами ($pH\ 2$) $k_{cat}=0,014\ c^{-1}$, $K'_m=8,4\cdot 10^{-3}\ M$ [2186], а гидролиз $AcPhePhe - k_{cat}=0,015\ c^{-1}$, $K'_m=0,16\cdot 10^{-3}\ M$ [2187]. Величина K_t для $AcPhe$ составляет $23\cdot 10^{-3}\ M$ [2187], т.е. довольно близка величине K'_m в реакциях изотопного обмена.

Было высказано мнение, что изотопный обмен происходит в результате реакции синтеза-гидролиза ациламинокислоты с некоторыми примесными пептидами, содержащимися в препаратах фермента, или (в случае карбоксипептидазы А) с продуктом отщепления ацильной группы [2188]. Однако обмен кислорода катализируется иммобилизованным ферментом (пепсин), тщательно отмытым от приме-

сей низкомолекулярных веществ и не подвергающимся в ходе инкубации автолитическим реакциям [2189].

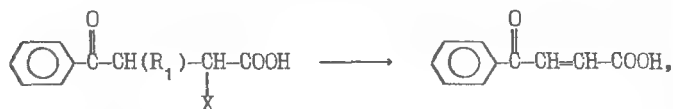
4.8.3. Енолизация кетонов, α β -элиминирование и др.

Было показано [2190-2192], что карбоксипептидаза А катализирует обмен водорода в α -CH₂-группе кетонов - аналогов субстрата этого фермента:



Очевидно, что реакция идет через енольную форму кетона. Скорость этой реакции довольно низка ($k_{\text{cat}}=3,7 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$). Однако оценка каталитического эффекта карбоксипептидазы А в этой реакции показывает, что фермент ускоряет ее в 10^4 - 10^5 раз по сравнению с модельной реакцией енолизации ацетона в присутствии уксусной кислоты.

Карбоксипептидаза А [2193,2194], а также дипептидилкарбоксипептидаза [2195] катализируют реакции α,β -элиминирования в замещенных γ -кетокислотах:



где $\text{R}_1 = \text{H}, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{X} = \text{Cl}, \text{SC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ - n .

Отщепление HCl идет с константой скорости второго порядка $k_{\text{cat}}/K_m=3300 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$, тогда как катализируемый щелочью процесс идет с $k_{\text{OH}}=0,18 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ [2194].

Наконец, еще в 1955 г. сообщалось о катализе химотрипсином гидролиза С-С-связи в этиловом эфире 5-(n -оксифенил)-3-кетоглутаровой кислоты с образованием n -оксифенилпропионовой кислоты [2196]. Однако подтверждения этим данным не последовало.

4.9. Заключение

Многочисленные амидгидролазы катализируют, за немногими исключениями, одну реакцию - гидролитическое расщепление амидной связи. Все многообразие этих ферментов обусловлено, главным образом, различием в специфичности, которое проявляется на разных уровнях структурной организации субстратов. Специфичность амидгидролаз, кроме этого, может проявляться на разных стадиях каталитического процесса - на стадии связывания субстрата и его химической трансформации. Во многих случаях изменение структуры субстрата ведет к увеличению k_{cat} без улучшения K'_m , и лишь по достижении максимальной для данного фермента (и данной серии субстратов) каталитической константы наблюдается снижение константы Михаэлиса. Для относительно простых серий субстратов

специфичность удастся описать количественно соотношениями типа линейных зависимостей свободных энергий, а в более сложных случаях – получить эмпирические корреляции на основе статистического анализа специфичности. Однако специфичность многих амидгидролаз не поддается такому анализу. Особенно это касается некоторых ферментов, специфичность которых приближается к абсолютной (например, ренин). Эффективность амидгидролаз изменяется в зависимости от типа субстратов в широких пределах. В то же время для ряда ферментов найдены субстраты, гидролизующиеся с константами скоростей, близкими к диффузионно-контролируемым процессам. Таким образом, эффективность ферментативного гидролиза, по-видимому, не лимитируется какими-либо особенностями химических механизмов катализа.

РЕГУЛЯЦИЯ И ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ

Регуляция активности амидгидролаз может осуществляться как на уровне их биосинтеза, так и на посттрансляционном уровне. В этой главе мы рассмотрим лишь второй тип регуляции, причем рассмотрим возможности изменения активности этой группы ферментов как *in vivo*, так и в энзимологических экспериментах вне организма.

Проблемы регуляции активности амидгидролаз рассмотрены в многочисленных обзорах [6,2197–2199]. Наиболее распространенный способ, особенно характерный для протеаз животных, заключается в активации зимогенов – неактивных предшественников протеолитических ферментов. Образующиеся при ограниченном протеолизе зимогенов активные ферменты сами могут служить активаторами других зимогенов, давая начало "каскаду" последовательных ступеней активации.

Активность ферментов, в том числе и амидгидролаз, сильно меняется при изменении состава среды – концентрации водородных ионов, ионной силы, характера микроокружения. Последнее имеет особенно важное значение для амидгидролаз, связанных в мембранных структурах. Важное значение имеет и температура среды, в которой они функционируют.

Еще один весьма эффективный способ регуляции активности амидгидролаз – это действие на них ингибиторов. Ниже мы рассмотрим действие как природных, так и синтетических ингибиторов.

Наконец, протеолитические ферменты обладают присущей только им способностью к самоинaktivации – автолизу.

Все эти воздействия создают весьма сложную и, очевидно, достаточно тонкую систему регуляции активности амидгидролаз в организме.

5.1. Зимогены и их активация

Как стало ясно, особенно при анализе структур генов, подавляющее большинство белков синтезируется клеткой в виде предшественников, которые затем "созревают", превращаясь в биологически активные белки.

Не составляют исключения и амидгидролазы. Предшественники обычно содержат на N-конце полипептидной цепи так называемую сигнальную последовательность, состоящую из 15–30 аминокислотных остатков (см. обзор: [2200]). Эта последовательность в различных белках не имеет практически никакой гомологии, однако в ней можно выделить три участка: *n* – участок, включающий различные остатки, но в целом характеризующийся положительным зарядом, *h* – участок (около 10–30 остатков) богат гидрофобными аминокислотными остатками и образует гидрофобный кор и *c* – участок, обычно незаряженный, но включающий полярные остатки. Собственно участок, расщепляемый сигнальными протеазами структурно соответствует так называемому правилу "–1,–3", согласно которому в положении –1 находится преимущественно Ala, а в положении –3 нет ароматических или заряженных остатков [1854].

Сигнальный пептид связан с пропоследовательностью. Размеры этой последо-

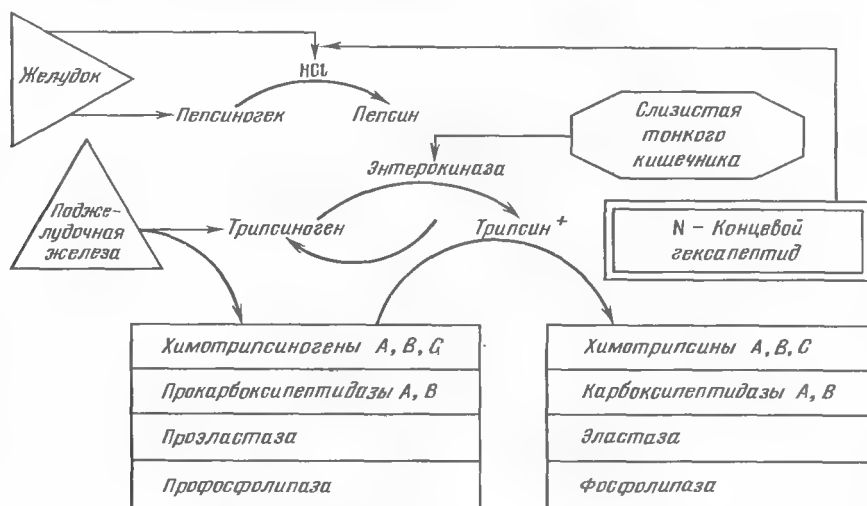


Рис.70. Схема активации зимогенов пищеварительных ферментов [5]

Вательности довольно сильно различаются. Так, у химотрипсиногена она включает 15 остатков [2201], а у субтилизина из *Bacillus subtilis* – 77 остатков [2202]. Эта последовательность уже связана с последовательностью зрелого белка. В случае химотрипсиногена после отщепления проучастка (по связи Arg-Ile) образуется неактивный зимоген, а в случае субтилизина – активный фермент.

Ключевое положение в системе активации многих ферментов поджелудочной железы занимает трипсин, который образуется из трипсиногена под действием энтеропептидазы (энтерокиназы) и активирует большинство других зимогенов (рис.70) [5,2203].

Активация бычьего и некоторых других трипсиногенов происходит в присутствии ионов Ca^{2+} и сопровождается отщеплением N-концевого гексапептида [2204]:



В случае свиного трипсиногена отщепляется октапептид [2205]:



Энтеропептидаза катализирует этот процесс примерно в 2000 раз эффективнее, чем трипсин, который также способен активировать трипсиноген.

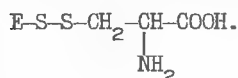
Для активационного пептида трипсиногена характерно наличие четырех остатков аспарагиновой кислоты, что позволяет N-концевому фрагменту локализоваться на поверхности глобулы и препятствует маскированию расщепляемой связи. Наличие большого числа заряженных аминокислотных остатков в активационном пептиде типично для многих зимогенов.

Действие трипсина на химотрипсиноген А приводит к разрыву связи Arg15–

Активация инициирующего каскад фактора XII идет, по-видимому, автокаталитически и существенно ускоряется поверхностями, имеющими заряд (стекло, каолин, декстрансульфат). Образующийся фактор XIIa (активный) может катализировать превращение прокалликреина в калликреин. Последний в присутствии декстрансульфата ускоряет превращение XII в XIIa в 11 000 раз по сравнению с условиями, когда заряженный компонент в системе отсутствует [2221].

Другая важная сериновая протеиназа – акрозин образуется из предшественника путем отщепления как N-, так и C-концевого пептида, содержащего большое число остатков пролина [2222]. Аналогичная картина наблюдается у аквализина [2223], эластазы нейтрофилов и катепсина G [2224], причем у последних собственно активационный пептид состоит всего лишь из двух остатков – Gly и Glu. Предшественники обнаружены у коллагеназ [2225], растительных сериновых карбоксипептидаз [2226] и других ферментов. Интересно, что препоследовательность играет важную роль в правильном сворачивании белковой цепи некоторых микробных протеиназ – субтилизина [2227] и α -литической протеиназы [2228]. Еще один пример необычного механизма активации – активация фактора роста нервов [2229]. Этот белок содержит 1 атом цинка, который подавляет автокаталитическую активацию. При разбавлении раствора белка цинк диссоциирует и происходит активация профермента.

Для цистеиновых ферментов не удалось обнаружить предшественников. Исключение составляет протеаза из стрептококков [745,746,2230]. Внутриклеточная форма зимогена этого фермента содержит свободную SH-группу, которая в процессе транспорта во внеклеточное пространство превращается в метилдисульфид ($-S-S-Me$). Восстановление этой связи приводит к активации и автопроцессингу проформы (34 кДа) в активный фермент (28 кДа). Кристаллический папаин после выделения имеет очень низкую каталитическую активность, которая проявляется лишь в присутствии тиоловых соединений, восстановителей или CN^- -иона [1331]. Были получены убедительные данные [2231,2232], что в неактивном папаине каталитически активный остаток цистеина блокирован дисульфидной связью и представляет собой остаток цистина:



Возможно, что сходного типа неактивные предшественники имеются и у других цистеиновых протеаз.

Протеолитическое расщепление двухцепочечного (80 и 26 кДа) профермента калпаина II происходит автокаталитически по малой субъединице, в результате чего отщепляется фрагмент в 9 кДа и образуется фермент, активируемый низкими концентрациями Ca^{2+} [2072,2233].

Проферменты аспартатных протеаз животных устойчивы в нейтральной и слабощелочной среде и претерпевают автокаталитическую активацию при понижении pH среды до 2–4 [2234]. При этом в конечном счете отщепляется около 40 аминокислотных остатков с N-конца молекулы зимогена.

Механизм активации пепсиногена достаточно сложен. Биосинтез этого зимогена происходит в специальных клетках стенки желудка [2234] в виде препрофермента, содержащего 14–15 остатков лидерной последовательности [2235, 2236]. Существенным этапом активации является, по-видимому, конформационное

изменение, происходящее при переходе пепсиногена в кислую среду и приводящее к образованию каталитически активного зимогена – δ -пепсиногена [2064, 2086, 2237–2239]. Далее, в зависимости от pH, может происходить или внутри-молекулярный процесс отщепления активационного пептида [2240], или межмоле-

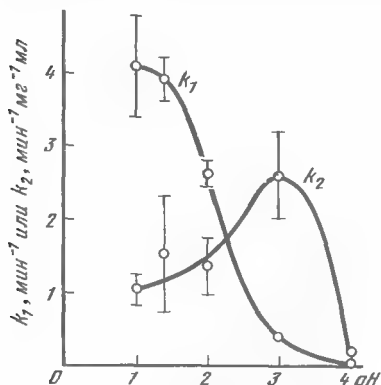


Рис.72. pH-Зависимость констант скорости 1-го (k_1) и 2-го (k_2) порядков реакции активации пепсиногена (вертикальные линии – среднее квадратичное отклонение) [2240]

кулярная реакция активации [2064, 2234]. Эти два процесса, по-видимому, конкурируют, и в зависимости от pH преобладает один или другой (рис.72).

У зимогенов разных аспартатных протеаз отщепление активационного пептида может происходить в одну или две стадии. Так, пепсиноген свиньи активируется преимущественно в две стадии – сначала расщепляется связь Leu16–Ile17, а затем связь Leu44–Ile45 [2065, 2241–2244]; в пепсиногене кур и химозине также происходит отщепление сначала продукта гидролиза по связи Phe27–Leu28 и лишь затем происходит разрыв связи Leu42–Thr43 (куриный зимоген) или Phe42–Gly43 (химозин) [2127, 2245, 2246]. Следует отметить, что, по крайней мере, для прохимозина расщепление по связи 27–28 не является обязательным. При pH 4,5 прохимозин, в котором направленным мутагенезом изменена последовательность в этой области, нормально активируется, однако при pH 2 активация не происходит [2127]. В пепсиногене А человека внутримолекулярно расщепляется связь Leu23–Lys24, а межмолекулярно – связь Leu47–Val48 [2247]. Вообще, участок первоначального расщепления зависит от структуры активационного пептида и специфичности образующегося фермента. Наличие в положении P_3 активационного пептида основных аминокислотных остатков препятствует разрыву на этом участке [2246] (табл.53). Интересно, что пептид 1–16 довольно сильно ингибирует активность пепсина [837, 2248–2252]. Активация пепсиногенов происходит также под действием ряда ферментов микроорганизмов [2253].

Другая аспартатная протеаза – катепсин D также синтезируется в виде предшественника с молекулярной массой 53 кДа [1168, 2254–2258], который последовательно превращается в промежуточную форму с M_r 47 кДа и затем в двухцепочечную – 31 и 13–14 кДа (у бычьего профермента за счет выплывания дипептида SerSer [2259]). Активация происходит внутри лизосом и сопровождается расходом АТФ, по-видимому, для повышения концентрации H^+ -ионов [2258]. Предполагается, что в активации прокатепсина D участвует цистеиновая протеиназа.

Почечный ренин также синтезируется в виде препрофермента с M_r ≈ 50 кДа, содержащего 20 остатков лидерного пептида и 46 остатков пропоследовательности [2260]. Неоднократно сообщалось [2261–2264] об обнаружении высокомолекулярных, неактивных форм этого фермента, причем предполагалось [2265], что эта форма представляет собой комплекс ренина с кислотолabileм ингибитором. Однако, по-видимому, это проренин [2263, 2266]. Активация проренина

Таблица 53. Последовательность в области расщепляемых участков у зимогенов аспаратных протеиназ (по [2246])

	10	15	20	25	30	35
Пепсиноген А свиньи	RKKS	L RQNL	IKDGK	LKD↓F	LKTHKN	PNAS
То же быка	KKKS	L↓RQNL	IENGK	LKE↓F	MRTHKN	NLGS
Прохимозин теленка	KGKS	L RKAL	KEHGL	LED F↓	LQKQYG	ISS
Пепсиноген кур	KGKS	L RKQL	KDHGL	LED F↓	LKKHPYN	PAS
Прогастриксин человека	KFKSI/L	RETM	KEKGL	LED F↓	LRTHKYD	PAS
Пепсиноген А человека	RKKS	L RRTL	SERGL	LKD↓F	LKKHNL	PARK
Пепсиноген III3 обезьян	RKKS	L RRNL	SEHGL	LKD↓F	LKKHNL	NPAS
" медведя	KKKS	L RKVL	KEHGL	LKD↓F	LKKHSPN	PAS

↓ - основные расщепляемые связи.
↓ - минорные расщепляемые связи.
* - связи, не расщепляемые вследствие основного остатка в P₃-положении.

идет в плазме крови двухступенчато с образованием активированной промежуточной формы за счет индуцируемого H⁺-ионами конформационного изменения и последующего протеолитического расщепления по связи Arg-Leu под действием ферментов плазмы - калликреина или плазмина [2267].

Значительно сложнее происходит активация прокарбоксипептидазы А [2268, 2269]. Этот зимоген состоит из трех субъединиц, из которых лишь одна - субъединица I - является собственно зимогеном карбоксипептидазы А, а две другие - химотрипсиноген С и неактивная форма эластазоподобного фермента - протеазы Е [503, 2270]. Прокарбоксипептидаза А имеет молекулярную массу около 45 кДа [2271] (другая форма у свиньи 71 кДа [2272]) и значительно быстрее активируется трипсином, будучи выделена из комплекса (в виде сукцинилизированного производного), чем в составе комплекса. При этом отщепляется около 100 аминокислотных остатков [2273-2276] и образуется смесь нескольких форм фермента, отличающихся N-концевой аминокислотой (см. разд. 2.4.4). Следует отметить, что в поджелудочной железе акулы прокарбоксипептидаза содержится в мономерной форме [303].

Интересно упомянуть данные о процессинге мембранного фермента препенициллиназы из *Bacillus licheniformis* [2277, 2278]. Зимоген этого фермента и сам фермент - липопротеины, содержащие в положении Cys27 (профермента) ацетилглицеридную группу. Активация идет путем расщепления связи Gly26-Cys27, причем липидный остаток, по-видимому, определяет локализацию белковой цепи в мембране.

Как уже отмечалось, у многих микробных амидгидролаз нет проформы, т.е. истинного зимогена. Активация происходит сразу после отщепления лидерной (сигнальной) последовательности. Вообще предполагается [4], что зимогены появились на поздних этапах эволюции. Так, у трипсиногенов морских звезд, по-видимому, нет предшественников [2279], нет их и у химотрипсиноподобных

ферментов из *Streptomyces griseus* [2280].

Интересно рассмотреть отличия в пространственной структуре ферментов и их зимогенов. Этот вопрос был подробно исследован на примере пары α -химотрипсин – химотрипсиноген А [1229,2281–2283]. Наибольшие изменения происходят в области расщепляемых связей Ile16 и Arg145. Остаток Ile16 имеет решающее значение для формирования активного центра фермента, так как он образует солевую связь своей аминогруппой с карбоксильной группой остатка Asp194, которая в зимогене экспонирована в область связывающего субстрат участка белка. Существенные изменения происходят и в области остатков 189–193, образующих эту субстратсвязывающую область. В результате активации химотрипсиногена происходят два важнейших события – формирование субстратсвязывающего участка и формирование так называемой оксианионной полости за счет изменения ориентации карбонильной группы остатка Gly193 [1229]. Что касается каталитического аппарата – "системы переноса заряда", образуемой остатками Asp102–His57–Ser195, то в зимогене она сформирована более четко, чем в самом ферменте [1229]. По-видимому, вследствие этого химотрипсиноген обладает некоторой каталитической активностью. Как химотрипсиноген, так и трипсиноген медленно реагируют с диизопропилфторфосфатом [2284] по каталитически активному остатку серина, связывают конкурентные ингибиторы [2285], а трипсиноген образует прочный комплекс с панкреатическим трипсиновым ингибитором [1233,2286]. Было показано [2287], что пептиды (например, IleVal) индуцируют переход трипсиногена в конформацию, характерную для трипсина, т.е. эти пептиды способны как бы замещать N-концевой фрагмент зимогена, формируя связывающий участок активного центра. Предполагается, что аналогичный механизм реализуется при активации плазминогена стрептокиназой [2287,2288].

Таким образом, по крайней мере для трипсина и химотрипсина основное различие зимогенов от активных протеаз – конформационное. Это подтверждается также данными по химической модификации ферментов (см., например: [2289, 2290]) и многочисленными физико-химическими исследованиями [2291–2293].

Необходимо отметить, что различие в конформациях зимогена и фермента сказывается, по-видимому, в большей степени на активности в отношении специфических субстратов и в меньшей степени на активности в отношении "плохих" субстратов [2290,2294].

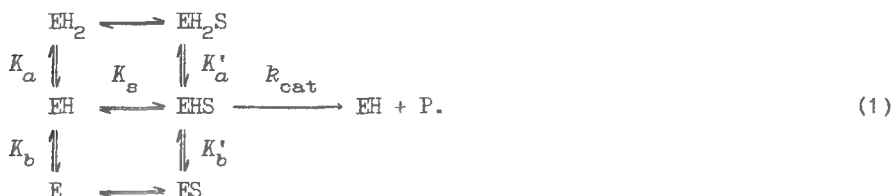
5.2. Влияние pH среды

Диапазан активности амидгидролаз охватывает интервал примерно в десять единиц pH. Внутри каждой группы ферментов область активности локализована в более узких пределах. Однако встречаются ферменты, функционирующие в области, далекой от оптимума pH для большинства представителей данной группы.

Исследования pH-зависимости кинетических констант ферментативного гидролиза и особенно констант скоростей индивидуальных стадий процесса дает важную информацию о характере групп фермента, участвующих в связывании субстрата и его превращении, а также о механизме реакции (см. обзоры: [1613, 1659,1661]).

5.2.1. Кинетические закономерности

Изменение констант скорости и равновесия фермент-субстратного взаимодействия обусловлены изменением состояния ионизации участвующих в этих взаимодействиях групп. В простейшем случае изменение pH приводит к протонированию или депротонированию по крайней мере двух ионизирующихся групп фермента, участвующих в катализе:



Если все три формы фермента (E, EH и EH₂) способны связывать субстрат, но химическое превращение происходит только с одним комплексом (например, EHS), то соответствующее выражение для скорости реакции будет:

$$v = \frac{(k_{\text{cat}}/f') [E]_0 [S]_0}{K_m f'/f' + [S]_0}, \quad (2)$$

где $f = 1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b/[\text{H}^+]$ и $f' = 1 + [\text{H}^+]/K'_a + K'_b/[\text{H}^+]$ - так называемые pH-функции Михаэлиса [1661, с.138].

Таким образом, получаемые в эксперименте кинетические константы будут связаны с концентрацией водородных ионов следующими соотношениями:

$$k_{\text{cat}} = \frac{\tilde{k}_{\text{cat}}}{1 + [\text{H}^+]/K'_a + K'_b/[\text{H}^+]}, \quad (3)$$

$$K_m = \frac{\tilde{K}_m (1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b/[\text{H}^+])}{1 + [\text{H}^+]/K'_a + K'_b/[\text{H}^+]}, \quad (4)$$

$$k_{\text{cat}}/K_m = (\tilde{k}_{\text{cat}}/\tilde{K}_m) \frac{1}{1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b/[\text{H}^+]}, \quad (5)$$

где $\tilde{k}_{\text{cat}}$ и $\tilde{K}_m$ - относятся к предельным, независимым от pH значениям констант. Из этих уравнений ясно, что в простейшем случае зависимости k_{cat} и K_m от pH уравнения (3) и (4) отражают ионизацию групп в фермент-субстратном комплексе, а соответствующая зависимость k_{cat}/K_m - ионизацию групп свобод-ного фермента.

Очевидно, что в области высоких концентраций ионов водорода членами, включающими K_b и K'_b в уравнениях (3)-(5), можно пренебречь. Логарифмируя полученные при этом условия выражения, для k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m имеем:

$$\lg k_{\text{cat}} = \lg \tilde{k}_{\text{cat}} - \lg(1 + [\text{H}^+]/K'_a), \quad (6)$$

$$\lg K_m = \lg \tilde{K}_m + \lg(1 + [\text{H}^+]/K_a - \lg(1 + [\text{H}^+]/K'_a)), \quad (7)$$

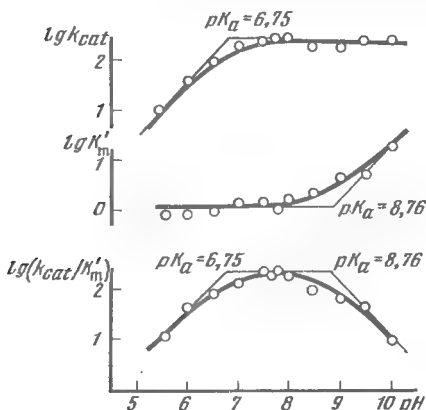
$$\lg k_{\text{cat}}/K_m = \lg(\tilde{k}_{\text{cat}}/\tilde{K}_m) - \lg(1 + [\text{H}^+]/K_a). \quad (8)$$

Как видно, при $[\text{H}^+] \ll K_a$ (и K'_a) соответствующие константы не зависят от pH, а при $[\text{H}^+] \gg K_a$ (и K'_a)

$$\lg k_{\text{cat}} = \lg \tilde{k}_{\text{cat}} - pK'_a + \text{pH}, \quad (9)$$

$$\lg \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \lg \frac{\tilde{k}_{\text{cat}}}{\tilde{K}_m} - pK'_a + \text{pH}. \quad (10)$$

Что касается значений K_m , то при $K_a = K'_a$ оно не зависит от pH. Если же соблюдается условие $K_a \ll [\text{H}^+] \ll K'_a$ или $K'_a \ll [\text{H}^+] \ll K_a$, то уравнение (7) редуцируется до



выражений, аналогичных (9) и (10). Таким образом, строя зависимости логарифмов кинетических констант от pH, можно определить значения pK'_a и pK'_a (рис. 73). Аналогично определяются значения pK_b и pK'_b [2295, 2296].

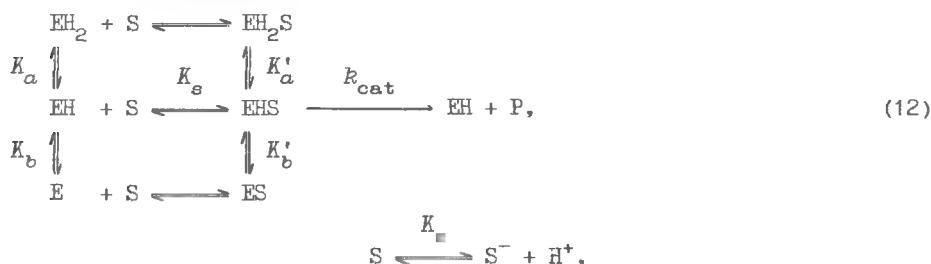
Рис. 73. pH-Зависимости кинетических констант гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина α -химотрипсином (25°C; $\mu=0,1$)

Предложены также и другие приемы определения этих величин [2297, 2298]. В более сложных случаях, например при четырех ионных состояниях фермента E, EH, EH₂ и EH₃ pH-функция Михаэлиса имеет вид:

$$f'' = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_b} + \frac{([\text{H}^+])^2}{K_a K_b} + \frac{K_o}{[\text{H}^+]}, \quad (11)$$

где K_o , K_b и K_a — константы ионизации форм EH, EH₂ и EH₃ соответственно. Зависимость $\lg k_{\text{cat}}$ от pH в этом случае будет представлять собой ряд отрезков с наклонами +2, +1, 0 и -1.

Субстратами многих амидгидролаз являются соединения, несущие ионогенные группы. Учет ионизации субстрата приводит к довольно сложным зависимостям кинетических констант от pH. Для простейшего случая, когда фермент связывает только одну форму субстрата, а константа диссоциации свободного фермента и фермент-субстратного комплекса одинаковы:



скорость реакции выразится так:

$$v = \frac{\tilde{k}_{\text{cat}} [\text{E}]_0 [\text{S}]_0}{1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b/[\text{H}^+]} \cdot \frac{1}{\tilde{K}_s (1 + K_s [\text{H}^+]) + [\text{S}]_0}. \quad (13)$$

5.2.2. Интерпретация значений констант ионизации

При выводе уравнений, связывающих кинетические параметры с pH, делается ряд допущений, а именно: 1) группы ведут себя как идеально титрующиеся кислоты и основания, причем изменение состояния ионизации других ионогенных групп, не участвующих в связывании и превращении субстрата, не влияет на ионизацию рассматриваемых групп; 2) активна только одна форма фермента; 3) процессы переноса протонов осуществляются быстрее химических процессов; 4) лимитирующая скорость всего процесса стадия остается одной и той же при всех значениях pH; 5) фермент устойчив при всех значениях pH [2299].

Рассмотрим подробнее выполнимость этих условий. Белок содержит большое число ионогенных групп, расположенных обычно на его поверхности. Состояние ионизации этих групп может влиять на pK_a групп, участвующих в связывании субстрата и в катализе [2300]. Ниже приведены значения pK_a каталитически активных групп химотрипсина и его производных, имеющих различный поверхностный заряд [1613, с.177]:

Фермент	Тип модификации	pK_a
Химотрипсин	-	7,0
Сукцинилхимотрипсин	$\text{E-Lys}(\text{NH}_3^+) \rightarrow \text{E-Lys}(\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-)$	8,0
Этилендиаминхимотрипсин	$\begin{array}{c} \text{Asp}(\text{COO}^-) \\ \text{E} \quad \quad \quad \text{E} \\ \text{Glu}(\text{COO}^-) \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{Asp}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+) \\ \text{E} \quad \quad \quad \text{E} \\ \text{Glu}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+) \end{array}$	6,1

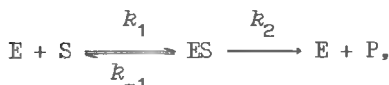
Эффекты поверхностного заряда особенно сильно проявляются при низких ионных силах раствора. Следует отметить, что сукцинирование практически не изменяет конформацию химотрипсина [2301].

Условие активности только одной формы фермента обычно выполняется, хотя известны случаи наличия на кривых pH-зависимости двух или более максимумов,

которые можно интерпретировать как результат активности нескольких ионных форм. Это явление, однако, может быть связано также или с наличием в препарате примесей другого фермента, активного при ином значении pH, или с процессами активации анионом (например, хлора) и т.п.

Условие быстрого установления прототропного равновесия, как правило, выполняется. Наиболее сложный и интересный вопрос заключается в постоянстве лимитирующей скорости стадии.

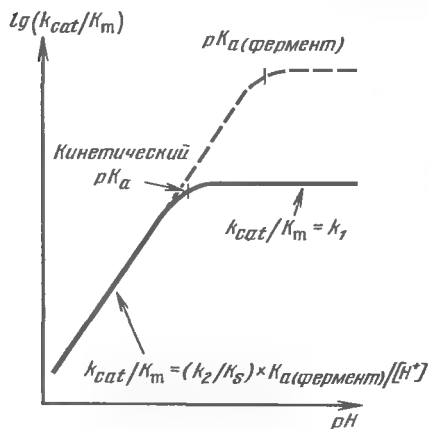
Уже для простейшей схемы



подчиняющейся не кинетике Михаэлиса ($k_{-1} \gg k_2$), а кинетике Бриггса-Холдейна ($k_{-1} \approx k_2$), могут возникать сложности, обусловленные изменением соотношения k_{-1} и k_2 при изменении pH. Так, оказалось [2297, 2298, 2300, 2302], что pK_a свободного химотрипсина для быстро гидролизуемого субстрата *n*-нитрофенилового эфира ацетил-*L*-триптофана на 0,3 единицы меньше, чем pK_a по гидролизу этилового эфира или амида ацетил-*L*-фенилаланина (pK_a свободного фермента, по определению, не должно зависеть от типа субстрата) (рис.74).

Это обусловлено тем, что при высоких pH для *n*-нитрофенилового эфира соблюдается условие $k_2 > k_{-1}$, а при понижении pH k_2 становится меньше k_{-1} , т.е. при высоких pH $k_{cat}/K_m = k_1$, а при низких — $k_{cat}/K_m = k_2/K_s$.

Рис.74. График, поясняющий различие между истинным и "кинетическим" pK_a в механизме Бриггса-Холдейна, обусловленное изменением лимитирующей стадии с изменением pH [2298]

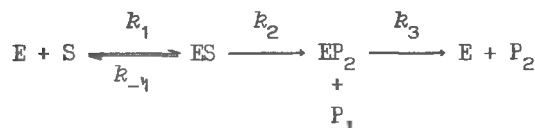


Наблюдаемое кинетическое значение константы ионизации в этом случае равно:

$$K_k = K_a \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}, \quad (14)$$

где K_a — истинная константа ионизации группы фермента.

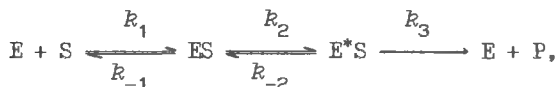
В случае трехстадийной схемы:



изменение pH может приводить к смене лимитирующей скорости стадии. При этом, если обе стадии контролируются группами с разными значениями pK_a (или

pK_a групп меняется при переходе от одной стадии к другой) зависимость k_{cat} и K_m от pH могут иметь довольно сложный характер, однако смена лимитирующей скорости стадии не должна сказываться на виде зависимости k_{cat}/K_m от pH.

Если на пути от субстрата к продукту образуется не один, а несколько фермент-субстратных комплексов, например:



то кинетический параметр

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_3 K_P}{K_s}, \quad (15)$$

$$\text{где } K_P = \frac{k_2}{k_{-2} + k_3}.$$

Очевидно, что и здесь измеряемое в опыте значение pK_a свободного фермента может зависеть от типа субстрата в том случае, если изменение pH по-разному влияет на K_P для разных фермент-субстратных комплексов.

Значения pK_a , получаемые из pH-зависимости величин k_{cat} и K_m , могут отличаться от истинных значений pK_a ионизации групп фермент-субстратного комплекса, если значительная часть субстрата связывается непродуктивно. В этом случае наблюдаемое значение pK_a (pK'_a) будет [2000]:

$$pK'_a = pK_a - \lg \frac{1+K}{1+K'}, \quad (16)$$

где K и K' — константы равновесия между продуктивными (ES и ES') и непродуктивными (HES и ES') комплексами. Значение pK_a свободного фермента (из зависимости k_{cat}/K_m от pH) не будет изменяться при наличии непродуктивного связывания.

Многие амидгидролазы неустойчивы при крайних значениях pH, подвергаясь обратимым или необратимым конформационным изменениям. В общем виде зависимость каталитических констант от pH в случае перехода одной формы фермента в другую рассмотрена в работе [2303]. Протеолитические ферменты, кроме того, могут подвергаться автолизу (см. разд. 5.11). Например, большинство аспартатных протеаз устойчиво лишь в кислой или слабокислой среде и необратимо инактивируются при $pH > 6$. Сериновые протеазы обратимо инактивируются в сильноокислой среде [1375]. Весьма подробно была исследована обратимая инактивация химотрипсина при высоких значениях pH [2304–2308]. Оказалось, что уже при pH 6–8 раствор этого фермента содержит около 10% неактивной формы, теряющей способность связывать субстрат (рис. 75). Конформационный переход активной формы химотрипсина в неактивную обусловлен разрывом солевой связи Ile16–Asp194, причем в неактивной форме аминокислота Ile16 имеет нормальное значение pK_a (7,8), а в активной — существенно более высокое (~ 10). Субстраты и субстратоподобные ингибиторы смещают равновесие в сторону активной формы.

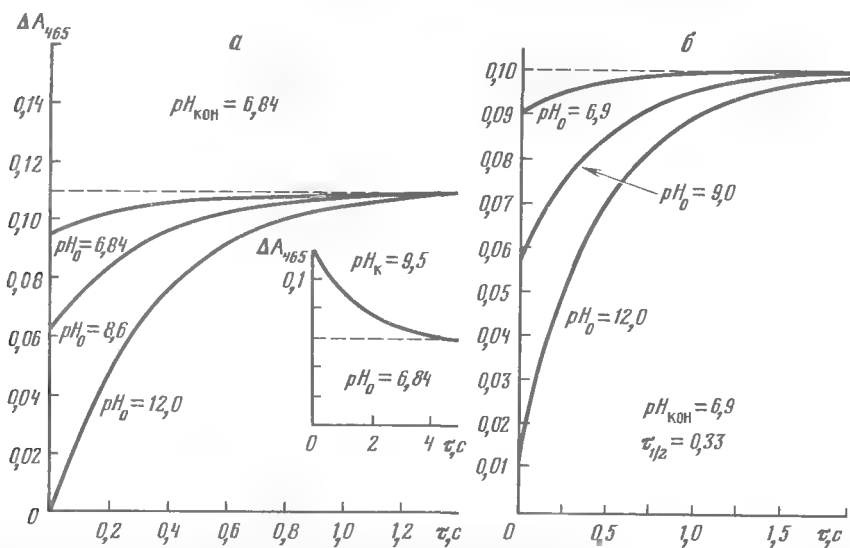


Рис. 75. Кинетика связывания профлавина химитрипсином при различных pH, иллюстрирующая наличие неактивной формы фермента [2306]

а - α-химотрипсин (на вставке: к ферменту при pH 6,84 добавляли раствор профлавина с pH 9,5); б - γ-химотрипсин. Фермент инкубировали в буфере с pH₀, смешивали с профлавином в концентрированном фосфатном буфере с pH_{кон} и измеряли разностное поглощение A_{465})

Пунктирная линия соответствует быстрой ассоциации профлавина с активной формой фермента. Кинетические кривые иллюстрируют скорость превращения неактивной формы в активную

Скорость перехода из активной конформации в неактивную относительно невелика ($k=0,6 \text{ с}^{-1}$ при pH 6,3 и 25° С [2306]) и поэтому может влиять на наблюдаемые кинетические параметры гидролиза субстрата.

Другие примеры конформационных изменений, происходящих при изменении pH, можно найти в работах по бромелаину [2309], кlostрипаину [743], карбокси-пептидазе Y [2310] и т.д.

Таким образом, определяемые из данных по pH-зависимости значения pK_a групп фермента во многих случаях являются кажущимися значениями, приписать которые тем или иным функциональным группам довольно сложно. Это усугубляется еще и тем, что значения pK_a групп в белке могут сильно отличаться от их значений в модельных соединениях.

5.2.3. Экспериментальные данные

Из данных, приведенных в табл. 54, видно, что связывание субстратов, как правило, мало изменяет pK_a каталитически активных групп амидгидролаз. Для свободных ферментов значения pK_a мало зависят от типа субстрата, хотя встречаются исключения, которые трудно объяснить различиями в условиях определения. Особенно большие различия наблюдаются у пепсина. Так, значение pK_a для свободного фермента в случае субстратов, содержащих остаток His, совершенно иное, чем с нейтральными субстратами. То же самое наблюдается для пептидов GlyGlyPhePheOEt, BzLysPhePheOEt и др. [1878, 2333], а также для

Таблица 54. Значение pK_a групп активных центров некоторых амидгидролаз

Фермент	Субстрат*	pK_a свободного фермента	K_a фермент-субстратного комплекса	Литературный источник
α -Химотрипсин	AcTrpOEt	6,77	6,86	[2311]
	AcPheAlaNH ₂	6,8	6,6	[2298]
	HTrpOEt	—	5,45; 7,5; 7,25	[2312]
β -Трипсин	ZLysONp	4,5; 7,1	4,6; 7,1	[2313, 2314]
	HLysOMe	—	5,42, 6,57, 7,25	[2315]
	BzAlaOMe	7,08	6,7	[2316]
β -Калликреин панкреатический	ZLysONp	4,4; 6,9	4,4; 6,9	[2314]
Эластаза лейкоцитарная	AcAla ₃ pNA	7,16	6,91	[2317]
Карбоксипептидаза Y	ZPheLeu	4,4; 6,5	5,4; 7,7	[2318]
	AcPheOEt	5,9; 8,9	5,2; 9,1	[2318]
Папаин	ZLysONp (pH<6)	3,35; 4,0	—	[2319]
	ZAlaOP	3,56; 8,07	—	[2320]
	BzArgpNA	—	4,3; 8,2	[2321]
Клострипаин	BzArgOEt	6,4; 8,35	8,25	[2322]
Пепсин	ZPhe(NO ₂)PheApm	2,9; 4,2	4,3	[2323]
	AcPheTyrNH ₂	1,17; 4,35	1,35; 4,15	[2324]
	AcPheTyrOH	1,17	1,12; 3,7	[2324]
	ZHisPhePheOEt	3,7; >5	3,5; 5,2	[2325]
	ZHisPheTrpOEt	2,9; 5,4	—	[2326]
Химозин	ZGlyGlyLeu	6,19; 9,11	—	[2327]
	NBzPlaOH	9,4	6,28; 9,3	[2328]
Термолизин	FALeuNH ₂	6,2; 7,8	—	[2329]
Лейцинаминопептидаза (хрусталик)	HLeupNA (Mg ⁺)	8,8	—	[2330]
Аминопептидаза <i>Aeromonas</i>	HLeupNA	4,9; 7,55; 10,0; 10,7	5,3	[2331]
	Бензилпенициллин	5,6; 7,6	5,25; 8,2; 9,8	[2332]
β -Лактамаза II	Цефаллоспорин	5,5; 9,8	4,2; 8,3; 10,7	[2332]

* ONp — *n*-нитрофениловый эфир; OP — фениловый эфир;
 pNA — *n*-нитроанилид; Apm — *N*-(3-морфолино)-пропиламид;
 NBz — *n*-нитробензол; FA — фурилаккрилоил.

пептидов, содержащих аминопропилморфолиновую С-защитную группу [2323]. Ни одно из этих соединений не должно изменять свое состояние ионизации в области исследуемых значений pH.

По-видимому, значения pK_a пепсина и некоторых других аспартатных протеаз не характеризуют ионизацию групп активного центра [2334].

Различия pK_a свободного пепсина для субстратов, содержащих свободную и защищенную С-концевую карбоксильную группу, обусловлены ионизацией послед-

ней при $\text{pH} \approx 3,5$ [2335–2337]. Это сопровождается увеличением константы диссоциации фермент-субстратного комплекса [2338]. Следует отметить, что наличие фосфатной группы в пепсине влияет на значения pK_a фермента [1216, 2339]. Так, было показано, что pK_a комплекса фермента с AcPheTyrOMe у дефосфорилированного пепсина равны 2,1 и 4,6, тогда как для нативного фермента эти значения составляют 1,6 и 4,1 [1216].

В табл. 54 для свободного химотрипсина приведено одно значение pK_a , хотя на самом деле обычно наблюдается еще одно значение в области 8,8–9,0. Это последнее значение обусловлено обсуждавшимся выше конформационным переходом в неактивную форму. Интересно отметить, что δ -химотрипсин более стабилен в щелочной среде, чем α -химотрипсин [2066, 2306].

Исследования, проведенные в широком диапазоне pH показали, что смена лимитирующей скорости стадии – довольно частое явление. Так, при гидролизе *p*-нитрофениловых эфиров ациламинокислот трипсином [2313] и панкреатическим калликреином [2340] в кислых pH лимитирует общую скорость стадия деацилирования, а при $\text{pH} > 4,4$ –4,8 – стадия ацилирования. В случае лейкоцитарной эластазы [2317] и папаина [2341] наоборот – в кислых pH медленной стадией является ацилирование, а при увеличении основности среды такой стадией становится деацилирование фермента.

Осложнения в определении pK_a каталитически активных групп могут возникнуть и вследствие недостаточно продуманного выбора условий. Например, определение pK_a химотрипсина при низких pH (5–6) и высоких концентрациях фермента приводит к неправильным результатам, так как эти условия максимально благоприятны для димеризации фермента, влияющей на величину k_{cat} [2298]. В папаине [2342–2347] pK_a остатка Cys25 зависит от того, включена ли его SH-группа в солевую связь с His159 или нет. В то же время pK_a His159 также зависит от наличия или отсутствия солевой связи. Кинетические исследования не позволяют различить два состояния, несущие одинаковый суммарный заряд:



Поэтому для решения вопроса об ионизации каталитически активных групп папаина широко используются физико-химические методы и методы химической модификации. Из физико-химических методов, используемых для определения pK_a каталитически важных групп фермента, следует в первую очередь отметить ЯМР [2348–2352], а также ИК-спектроскопию [2353–2355], разностную УФ-спектроскопию [2356, 2357] и флуоресцентный анализ [2356, 2358].

Использование методов химической модификации для тех же целей описано в работах [2359–2363]. Влияние pH на конформационное состояние фермента удастся выявить при рентгеноструктурном анализе кристаллов, выращенных при различных значениях основности среды [2352].

5.3. Влияние ионов и ионной силы раствора

Следует различать специфическое и неспецифическое действие ионов на ферменты. Специфическим является действие лишь одного типа ионов (анионов или катионов), тогда как неспецифическое действие вызывается ионами разной природы за счет изменения ионной силы раствора и обычно связано с их лиотропны-

ми свойствами. Многие амидгидролазы содержат в своем составе конституитивные ионы, играющие роль простетических групп. Влияние этих ионов рассмотрено в других разделах.

5.3.1. Специфические ионы

Ряд катионов и анионов могут активировать или ингибировать амидгидролазы. Среди активаторов наибольшее распространение имеют ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} . Ионы Ca^{2+} связываются с такими сериновыми протеазами, как химотрипсин, трипсин, эластаза и др. Однако они, как правило, не влияют на активность этих ферментов, а стабилизируют их в отношении автолитического расщепления [2364-2371]. Ниже приведены константы ассоциации некоторых сериновых протеаз с ионами Ca^{2+} [2368-2371]:

Фермент	$K \cdot 10^{-4}, \text{M}^{-1}^*$	Фермент	$K \cdot 10^{-4}, \text{M}^{-1}^*$
α -Химотрипсин	0,92	Термомикоплин	50,0
Трипсин свиньи	22,0	Субтилизин BPN [*]	10^6
Трипсин быка	11,0	Термитаза	10^8
Эластаза	21,0	Протеиназа К	10^3

*Приведены значения для наиболее прочно связывающегося иона Ca^{2+} .

Исследования связывания Ca^{2+} удобно проводить, вытесняя этот ион некоторыми ионами лантанидов (Tb^{3+} , Ln^{3+} , Ce^{3+}) и измеряя флуоресценцию присоединяющихся ионов (Tb^{3+}) или сдвиг линий в спектрах ЯМР [2372-2374]. Эти исследования, а также рентгеноструктурные данные позволили установить [1233, 2375], что в трипсине ион Ca^{2+} связывается в области остатков 70-80, образующих полипептидную петлю, причем акцептором иона служит Glu80. В химотрипсине в этом положении расположен остаток Ile, что объясняет значительно более низкое сродство Ca^{2+} к этому ферменту. Субтилизины и близкие им ферменты связывают от 2 до 4 ионов Ca^{2+} с разной степенью прочности.

Активация ионами Ca^{2+} была обнаружена для катионных химотрипсина и трипсина из поджелудочной железы овец [276], акрозина [335], термомикоплина [381] и ряда других сериновых протеаз.

Среди цистеиновых протеаз наряду с ферментами, активируемыми Ca^{2+} -ионами, такими, как клострипаин [743], имеется группа протеаз (калпаины), проявляющие абсолютную Ca^{2+} -зависимость, т.е. практически неактивных в отсутствие этих ионов [2376-2379] (см. табл.12). Эти протеазы содержатся в миофибриллах гладких мышц. Они не являются лизосомальными ферментами и, по-видимому, участвуют в катаболизме белков мышечной ткани.

Существует по крайней мере два типа калпаинов - калпаины I, активируемые микромолярными концентрациями ионов Ca^{2+} (физиологическая концентрация ≈ 10 мкМ [2380] и калпаины II, нуждающиеся в миллимолярных концентрациях этого иона. Оба типа калпаинов состоят из двух субъединиц - каталитической (около 80 кДа) и регуляторной (28-30 кДа). Было показано, что как тяжелая, так и

легкая субъединица содержит по 4 потенциальных Ca^{2+} -связывающих участков [886,892], причем имеются два типа таких участков – с высоким и низким сродством к Ca^{2+} [2381]. Эти участки расположены в С-концевом 4-м домене четырехдоменной тяжелой субъединицы и во 2-м, тоже С-концевом домене двухдоменной легкой субъединицы. Ca^{2+} -связывающие центры имеют характерную "E-F" структуру [2382]: $\text{Asp}(\text{Glu})-(\text{Xaa})-(\text{Asp})\text{Glu}-(\text{Yaa})_{6-8}\text{Glu}$. Каталитический центр калпаинов расположен в домене II тяжелой субъединицы. Этот домен может взаимодействовать с доменом IV, что приводит, по-видимому, к дерепрессии или активации фермента, как это имеет место в случае активации кальмодулином. Другой возможный механизм активации – взаимодействие этого домена с легкой субъединицей. Следует отметить, что автолиз легкой субъединицы повышает необходимую для активации концентрацию Ca^{2+} калпаина I [2383,2384], однако остается неясным, имеется ли связь между этим явлением и существованием двух типов калпаинов. Механизм репрессии-дерепрессии, возможно, связан с наличием в клетках эндогенных белковых ингибитора и активатора калпаина [2385,2386]. Активатор ($M_r \approx 40$ кДа) действует полностью антагонистически ингибитору, увеличивая сродство фермента к Ca^{2+} примерно в 100 раз [2387]. Ионы Ca^{2+} могут также влиять на ассоциацию протомеров в олигомерных ферментах [2388].

Довольно подробно изучено влияние Ca^{2+} на свойства металлсодержащей эндопептидазы – термолизина [2389-2391]. Здесь Ca^{2+} играет роль в сохранении термостабильности этого фермента [2390]. Термолизин связывает 4 иона Ca^{2+} с константами $K_{1,2}=2,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ и $K_{3,4} > 10^6 \text{ M}^{-1}$ [2392]. Два из них расположены рядом внутри молекулы в области остатков белка Asp138, Glu177, Asp185, Glu190 и Asp191, а третий и, возможно, четвертый ионы Ca^{2+} расположены близко к поверхности в области остатков 196-200. Наиболее близко расположенный ион Ca^{2+} отстоит от активного центра фермента на расстоянии 13 Å [2393,2394]. Ca^{2+} активирует также аминопептидазу А [979], коллагеназу [1095] и некоторые другие металлсодержащие протеазы.

Многие Zn^{2+} -содержащие аминопептидазы активируются ионами Mg^{2+} или Mn^{2+} [951,954]. Ионы Mg^{2+} связываются с лейцинаминопептидазой из хрусталика глаза с $K_D \approx 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. При этом наблюдается увеличение k_{cat} по гидролизу LeuNH_2 с $1,1 \cdot 10^5$ до $1,19 \cdot 10^6 \text{ мин}^{-1}$ без изменения величины K_m [954]. Активация лейцинаминопептидазы развивается во времени (3-6 ч при 30°). Анионы проявляют синергический эффект при активации катионами металлов [2395,2396].

По-видимому, довольно специфически действуют ионы Na^+ и K^+ на активность нейтральной протеазы из гипофиза быка [805] и на активность щелочной протеазы из мышц карпа [197], ингибируя эти ферменты.

Ионы тяжелых металлов действуют специфически на цистеиновые амидгидролазы. Этот факт был установлен еще в 1930 г. Кребсом [2397]. Наиболее активными ингибиторами цистеиновых протеаз являются ионы ртути. Такие металлы, как Cu^{2+} или Ag^+ , ингибируют некоторые сериновые протеазы. Эти ионы избирательно тормозят ацилирование сериновых протеаз специфическими и неспецифическими субстратами, но не влияют на стадию деацилирования ацилфермента [2398]. Химотрипсин ингибируется также ионами Pb^{2+} [2399], Zn^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} [2400].

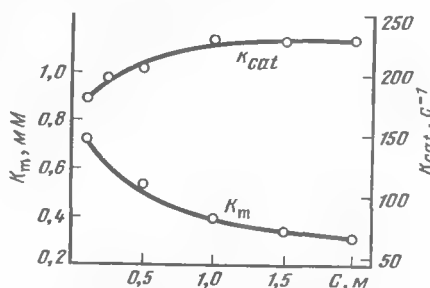
Специфическое влияние на активность амидгидролаз оказывают не только ка-

тионы, но и анионы. Отмечено, что ион хлора активирует некоторые амидгидролазы – дипептидилкарбоксипептидазу (ангиотензинпревращающий фермент) [2401], формилметионинаминопептидазу [823], аргиниламинопептидазу [682, 2402], катепсин С [2403] и дрожжевую аминопептидазу I [957]. В первом случае ион хлора влияет как на $V_{\max}$, так и на K_m , причем оказалось, что характер действия зависит от типа используемого субстрата [2404]. Было показано [2405], что Cl^- -ион изменяет спектральные свойства дипептидилкарбоксипептидазы, что, вероятно, связано с изменением конформации фермента. Этот ион взаимодействует с остатком лизина фермента [2406]. В некоторых случаях ион хлора действует как аллостерический активатор (см. разд.5.10) и может быть заменен ионами Br^- , I^- , CNS^- и др. [957]. Наконец, следует упомянуть специфическое действие фосфат-ионов на некоторые амидгидролазы. Так, фосфат-ион заметно изменяет специфичность стафилококковой протеазы [1852]: в фосфатном буфере этот фермент расщепляет связи, образованные остатками как Asp, так и Glu, а в аммонийном буфере – только связи, образованные глутаминовой кислотой. Полифосфаты (в том числе и АТФ) увеличивают каталитическую активность катепсина D [2407], причем этот эффект лишь частично может быть объяснен изменением ионной силы раствора. Неорганический фосфат влияет на активность глутаминазы [2408, 2409], аллостерически активируя этот фермент (см. также разд.5.9 и 5.10).

5.3.2. Влияние ионной силы раствора

Добавление солей может изменять каталитические свойства ферментов за счет увеличения ионной силы раствора [1404, гл.7; 2410]. Этот вопрос был подробно исследован на примере сериновых протеаз – химотрипсина и трипсина [2411–2415]. Было показано, что при гидролизе этилового эфира ацетил-L-тирозина химотрипсином изменение концентрации NaCl приводит к пропорциональному увеличению k_{cat} и уменьшению K_m (рис.76) [2415]. Интересно, что ионная

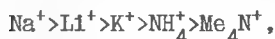
Рис.76. Зависимость кинетических констант катализируемого химотрипсином гидролиза этилового эфира N-ацетилтирозина от концентрации NaCl (pH 7,9; 25°C) [2415]



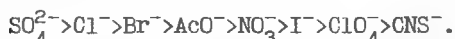
сила оказывает даже больший эффект на гидролиз химотрипсином специфических для трипсина субстратов типа BzArgOEt (примерно в 8 раз по k_{cat}/K_m), чем на гидролиз специфических для химотрипсина субстратов (в 3 раза); pH-зависимость кинетических констант практически не меняется при увеличении ионной силы в области pH 6–10, однако при более кислых значениях pH (<5) наблюдается обращение эффекта ионной силы на k_{cat} (по гидролизу AcTyrOEt) для химотрипсина. В случае трипсина эффект ионной силы носит обратный характер – с увеличением концентрации соли уменьшается k_{cat} и k_{cat}/K_m (для BzArgOEt примерно в 2 раза) и увеличивается K_m [2415], причем изменение pH в интервале 5–7 не сказывается на этом эффекте. Концентрация соли влияет в случае

химотрипсина, в основном, на константу скорости ацилирования фермента (k_2) и в меньшей степени на константу скорости деацилирования (k_3).

По своему эффекту различные катионы располагаются в ряд, идентичный липотропному ряду Гофмейстера:

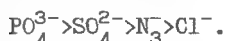


а анионы – в следующий ряд:



Влияние соли на константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, по крайней мере, в случае химотрипсина, можно объяснить так называемым высаливающим эффектом, т.е. влиянием на активность субстрата (γ_s) при постоянстве активностей фермента (γ_E) и фермент-субстратного комплекса (γ_{ES}) [2416]. Это справедливо при относительно больших концентрациях соли. При переходе от низких ее концентраций к высоким (больше 0,5 М) происходит, по-видимому, изменение конформации фермента [2416, 2417], что проявляется в параллельном с изменением активности изменении поглощения белка при 282 нм [2416].

Карбоксипептидаза А в отличие от химотрипсина ингибируется анионами, причем эффективность ингибирования снижается в ряду:



Предполагается, что ионы фосфата и хлора взаимодействуют с остатком Arg в субстратсвязывающем центре [2418], а ион N_3^- взаимодействует с атомом Zn [2419]. Следует отметить, что избыток ионов Zn подавляет активность карбоксипептидазы А [2420] и ряда других Zn-содержащих протеаз.

5.4. Влияние органических растворителей

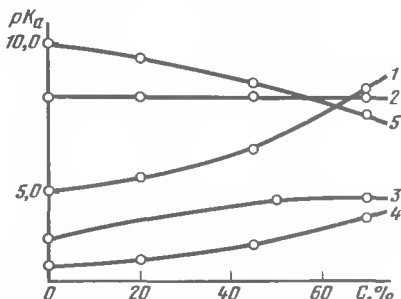
Органические растворители могут влиять на каталитическую активность ферментов, и в том числе амидгидролаз, изменяя диэлектрическую проницаемость раствора и коэффициент распределения субстрата между фазами растворителя и белка, а также специфически конкурируя с субстратом за активный центр. Кроме того, растворители, содержащие нуклеофильные функциональные группы, могут конкурировать с водой в гидролитических реакциях. Здесь будут кратко рассмотрены лишь два первых эффекта растворителя.

Изменение диэлектрической проницаемости влияет на ионизацию компонентов буфера и на pK_a поверхностных групп белка (см. обзор в: [2421]). Это в свою очередь приводит к изменению pK_a групп, маскированных внутри глобулы, в том числе и групп активного центра фермента. Изменение констант диссоциации карбоксильной и аминогруппы в зависимости от содержания органического растворителя в воде может достигать нескольких порядков (рис.77) [2422, 2423].

Имеется много данных о влиянии изменения диэлектрической проницаемости на каталитические свойства ферментов (обзоры ранних работ см. в: [2424], с.205; 2425, гл.151). Так, линейная корреляция скорости катализируемого трипсином гидролиза BzArgOEt и обратной величины диэлектрической проницаемости ($1/D$) была обнаружена для большого числа смесей воды с органическими

Рис.77. Зависимость pK_a ионогенных групп некоторых соединений от концентрации диоксиана в воде

1- уксусная кислота; 2- трис;
3- бензоиларгинин; 4- глицин (COOH);
5- глицин (NH_3^+)



растворителями [2426]. Изменение состава среды относительно мало влияет на k_{cat} , но значительно изменяет величину K_m [2423, 2427, 2428]. pH-Зависимости k_{cat} в воде и в водно-органических смесях практически не отличаются [2423]. Было показано [2429], что многие протеазы в водно-органических растворителях теряют амидазную, но сохраняют эстеразную активность. Исследования влияния органических растворителей на кинетику ферментативного гидролиза осложняются специфическими эффектами, о которых говорилось выше [2427, 2430], а также довольно узким диапазоном изменений диэлектрической проницаемости, используемым в большинстве работ. Изучение гидролиза AcTrpOEt и BzArgOEt, катализируемого соответственно химотрипсином и трипсином в широком интервале значений диэлектрической проницаемости, показало отсутствие корреляции $1/D$ и значений k_{cat} и K_m . В системах, где преобладают электростатические фермент-субстратные взаимодействия, изменения диэлектрической проницаемости среды не влияют на K_m . В то же время наблюдается хорошая корреляция $\lg k_{cat}/K_m$ и величины свободной энергии переноса субстрата из воды в смешанный растворитель. По-видимому, влияние органического растворителя на K_m проявляется в том случае, когда в образование фермент-субстратного комплекса существенный вклад вносят гидрофобные взаимодействия [2431]. При высоких концентрациях органического растворителя исследования осложняются денатурационными процессами, однако этого не происходит, если реакцию проводить с суспендированным в сухом органическом растворителе ферментом.

Было показано [2032, 2432-2435], что в этих условиях химотрипсин, субтилизин и ряд других ферментов сохраняют свою активность в отношении таких реакций, как, например, переэтерификация. При этом наблюдается ряд необычных эффектов — теряется энантиоселективность фермента [2032], способность к дискриминации между полярными и гидрофобными субстратами [2432], наблюдается обращение специфичности к конкурентным ингибиторам [2433], появляется своего рода лигандиндуцируемая "память" фермента при его предобработке лигандом [2435]. Ферменты приобретают значительно более высокую стабильность к температуре и хранению [2433].

5.5. Кинетический изотопный эффект растворителя

Изучение кинетического изотопного эффекта растворителя дает важные сведения о механизме реакции и структуре переходного состояния (см. обзоры: [1405, 2436]). В случае ферментативных реакций проведение процесса в D_2O может вызвать изменение кинетических параметров не только за счет изменения скорости переноса протона на лимитирующей стадии, но и изменения сольватации

белка, конформации белковой молекулы и т.д. Замена H_2O на D_2O приводит к сдвигу наблюдаемого значения pH раствора так, что pH и pD связаны эмпирическим отношением

$$pH = pD + 0,4.$$

В то же время pK_a ионизирующихся групп возрастает в D_2O . Эти два эффекта могут компенсировать друг друга.

Как видно из табл.55, для большинства исследованных амидгидролаз кинетический изотопный эффект составляет 2-3. Противоречивые данные получены для пепсинового катализа, где некоторые субстраты не изменяют k_{cat} в D_2O , а другие дают близкий к обычному изотопный эффект.

Наблюдаемый сдвиг pK_a каталитически активных групп составляет $0,5 \pm 0,2$ единицы. Влияние D_2O на K_m проявляется обычно так, что эта величина уменьшается, т.е. фермент-субстратный комплекс (в тех случаях, когда $K_m = K_s$) становится прочнее. Это обусловлено, по крайней мере частично, увеличением гидрофобных взаимодействий в D_2O .

Таблица 55. Влияние D_2O на ферментативный гидролиз

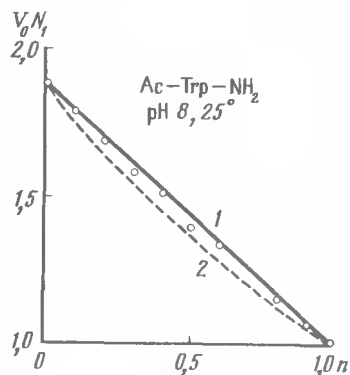
Фермент	Субстрат	pH	$\frac{k_{cat}(H_2O)}{k_{cat}(D_2O)}$	$\frac{K'_m(H_2O)}{K'_m(D_2O)}$	Литературный источник
α -Химотрипсин	$CH_3COOC_6H_4NO_2-n$	7,43	2,40	—	[2441]
	AcTyrOEt	8	1,8	—	[2311]
	AcTrpNH ₂	8	1,9	—	[2311, 2441]
Трипсин	$CH_3COOC_6H_4NO_2-n$	7,5	1,38	—	[2441]
	BzArgOEt	7,5-8,5	3,03	2,8	[2441, 2443]
	BzPheValpNA	7,44	4,3	—	[2441]
Эластаза	$CH_3COOC_6H_4NO_2-n$	7,5	2,45	—	[2441]
Тромбин	BzArgOEt	8,0	2,92	—	[2441]
Папаин	Циннамоил-имидазол	6,5-8,5	3,35	—	[1984]
Пепсин	AcPheTyrOMe	2,5	1,05	—	[2444]
	(Gly) ₃ Phe(NO ₂)-OMe	4	2,0	1	[2445]
Карбокси-пептидаза А	BzGlyPhe	7,47	1,33	1,55	[2446]
Аспарагиназа <i>Escherichia coli</i>	Asn	7,12	2,93	—	[2447]
Глутаминаза <i>Escherichia coli</i>	Gln	5,5	1,8	—	[2447]

Широкое распространение получили исследования зависимости скорости реакции от доли D_2O в H_2O [1504, 2437-2442]. Эти исследования позволяют сделать вывод о числе протонов, переносимых в переходном состоянии. Типичная зависимость такого рода представлена на рис.78.

Наконец, интересную информацию дает изучение температурной зависимости

Рис. 78. Типичные зависимости отношения скорости ферментативной реакции в воде (V_0) к скорости в смеси D_2O-H_2O (V_1) от доли (n) D_2O в H_2O [2439]

1- однопротонный катализ; 2- катализ с переносом нескольких протонов



кинетического изотопного эффекта. Как было показано [2443, 2448], при гидролизе химотрипсина и трипсина эфирных субстратов энергия активации одинакова как в D_2O , так и в H_2O и кинетический изотопный эффект целиком обусловлен изменением предэкспоненциального множителя. Этот факт трактуется как свидетельство применимости для ферментативного катализа квантово-механической модели переноса протона, включающей его туннелирование (см. гл.3).

5.6. Влияние температуры и давления

5.6.1. Теория

Как и для всякой химической реакции, зависимость константы скорости от температуры в реакциях, катализируемых амидгидролазами, описывается уравнением Эйринга-Поляни (см. обзоры: [1661, 2449]):

$$\ln k = \ln \frac{kT}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad (17)$$

где k - константа Больцмана; T - абсолютная температура; h - постоянная Планка; R - универсальная газовая постоянная; $\Delta S^\ddagger$ - энтропия и $\Delta H^\ddagger$ - энтальпия активации.

Температура также влияет на константу диссоциации фермент-субстратного комплекса в соответствии с уравнением Вант-Гоффа

$$\ln K_s = \frac{\Delta S_o}{R} - \frac{\Delta H_o}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad (18)$$

где $K_s = 1/K_s$, а ΔS_o и ΔH_o - энтропия и энтальпия комплексообразования.

Константа скорости второго порядка k_2/K_s будет, таким образом, связана с температурой выражением:

$$\ln \frac{k_2}{K_s} = \ln \frac{kT}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger - \Delta S_o}{R} - \left(\frac{\Delta H^\ddagger - \Delta H_o}{R} \right) \cdot \frac{1}{T}. \quad (19)$$

Строя зависимости логарифмов кинетических констант от обратной температуры, можно определить значения $\Delta S^\ddagger$, ΔS_o , $\Delta H^\ddagger$ и ΔH_o .

Особенности температурной зависимости ферментативных реакций по сравнению с неферментативными являются следующие: 1) значения энтальпии и энтро-

или ферментативного процесса могут иметь смысл, только если соответствующие кинетические константы относятся к элементарному акту химического превращения субстрата или к истинной константе равновесия (то же, несомненно, справедливо и для неферментативной реакции, но в этом случае проверить выполнимость указанного требования значительно легче); 2) зависимость кинетических констант от температуры, описываемая уравнениями (17)–(19), соблюдается для ферментативных реакций в сравнительно узком интервале температур, определяемом точкой заморзания раствора и устойчивостью фермента к тепловой денатурации; 3) температура может изменять pK_a каталитически активных групп фермента и тем самым изменять скорость реакции; 4) на графиках Аррениуса для ферментативных реакций часто наблюдаются изломы, причины которых будут обсуждены ниже.

Существует мнение [2450], что уравнение Эйринга-Поляни и эмпирическое уравнение Аррениуса

$$\ln k = \ln A - \frac{\Delta E}{RT} \quad (20)$$

неприменимы к реакциям биополимеров. Основная аргументация при этом сводится к следующему: а) $\Delta H^\ddagger$ и ΔE – независимые величины, а связывающее их выражение

$$\Delta H^\ddagger = \Delta E - RT \quad (21)$$

имеет лишь тот смысл, что существует некоторая температура T , при которой зависимости $\ln k$ от $1/T$, описываемые уравнениями (17) и (20), имеют одинаковый наклон; б) постоянство ΔS , A , ΔH и ΔE в ферментативных реакциях кажущееся, обусловленное узостью температурного интервала измерений; в) даже в этом узком интервале изменение температуры приводит к изменению структуры биополимера; г) образование фермент-субстратного комплекса приводит к значительным перестройкам белковой молекулы.

При всей основательности этой критики все же измерения кинетических констант в зависимости от температуры широко используются для характеристики ферментативных реакций; по-видимому, они имеют смысл, особенно, если проводится сравнение серии однотипных субстратов. Кроме того, широкое распространение получают прямые калориметрические методы измерения тепловых эффектов реакции, лишенные ряда перечисленных недостатков, а также расширяется диапазон температур измерений с использованием криоэнзимологических методов (см. разд. 5.7).

Как равновесие обратимой реакции, так, следовательно, и скорость ее могут изменяться при изменении давления. Экспериментально это обнаруживается при давлениях, превышающих 1000 атм. Изучая влияние давления на константы скоростей ферментативных реакций, можно получить важные сведения об их механизме (см. разд. 5.6.2). Измерение влияния давления на K_m позволяет вычислить изменение объема (ΔV) при образовании комплекса Михаэлиса, а из данных по изменению константы скорости можно получить величину объема активации ($\Delta V^\ddagger$) [2451]:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} P,$$

где k_0 — константа скорости при $P = 0+1$ атм.

Строя зависимости логарифма константы от давления получают прямую (если $\Delta V^\ddagger$ не зависит от давления) с наклоном $-\frac{\Delta V^\ddagger}{RT}$. Объем активации прямо связан с энтропией активации и характеризует изменение в структуре переходного состояния по сравнению с основным состоянием реагирующей системы.

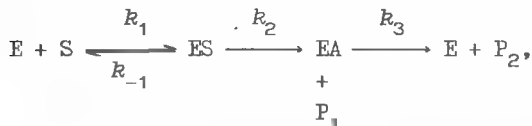
5.6.2. Экспериментальные данные

Анализ данных табл.56 позволяет сделать вывод о том, что специфичность фермента может определяться изменением как энтальпии, так и энтропии активации. Относительный вклад каждого из этих параметров зависит от типа катализатора и выбранной серии субстратов. Так, скорость деацилирования N-ацил-аминоацилхимотрипсина определяется, в основном, изменением энтальпии активации (см. рис.60), тогда как переход от этих производных к соответствующим производным фермента, ацилированного алифатическими кислотами, приводит к изменению энтропии активации стадии деацилирования, а энтальпия процесса изменяется очень мало [1992]. Энтальпийный "контроль" четко проявляется при пепсиновом катализе, тогда как в случае эластазы преобладает вклад энтропии.

Представление о том, что специфичность определяется уменьшением числа вращательных степеней свободы "хорошего" субстрата, т.е. определяется, главным образом энтропией основного состояния [1987], оказалось неправильным. Как было показано [1992,2453], данные, лежащие в основе этих представлений, получены в условиях, когда компоненты буфера (трис) сильно влияют на скорость деацилирования.

Следует отметить, что во многих экспериментах по температурной зависимости кинетических констант наблюдались изломы на графиках Аррениуса [1907, 2452,2457,2461,2462]. Такие изломы могут быть обусловлены несколькими причинами [2463]: а) сменой определяющей скорость стадии; б) конформационными изменениями фермента; в) температурно-зависимыми изменениями ΔH или ΔS .

В первом случае, если реакция идет по обычной для сериновых и цистеиновых протеаз трехстадийной схеме



переход от определяющей скорость стадии ацилирования к определяющей скорость стадии деацилирования должен приводить к излому на графиках $\ln k_{cat} + 1/T$, но график $\ln k_{cat}/K_m$ от $1/T$ должен оставаться линейным.

Во втором случае

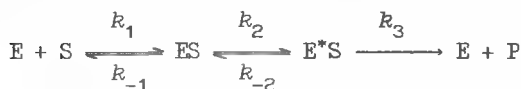


Таблица 56. Термодинамические параметры активации ферментативного гидролиза

Фермент	Субстрат	Кинетический параметр	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$, е.е.	Литературный источник
α -Химотрипсин	$\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$	k_2	20,5	+13,5	[2452]
		k_3	15,0	-18,0	[2452]
		k_3	9,7*	-15,9*	[1987]
	AcPheOMe	k_2	16,9	+11,7	[2453]
		k_3	10,1	-14,8	[2453]
	AcTrpOMe	k_3	12,3	-10,0	[2454]
	Fa-Im	k_2^{**}	7,8	-	[2455]
		k_3^{**}	15,0	-	[2455]
		k_3	19,4	-5,8	[2456]
Трипсин	TosArgOMe	k_3	5,4	-31,4	[2457]
		k_3	9,77	-17,2	[2458]
Эластаза	$\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2-n$	k_2/K_s	10,2	-16,1	[2459]
		k_2/K_s	8,6	-9,98	[2459]
		k_2/K_s	8,53	-7,49	[2459]
Субтилизин	AcPheOMe	k_2/K_s	3,83	-23,9	[2019]
Пепсин	ZPhe(NO ₂)PheApm	k_{cat}	7,8	-39,3	[1907]
	ZLeuValPhe(NO ₂)-AlaApm	k	3,4	-44,6	[1907]
Карбоксипептидаза А	ZGlyGlyPhe	k_{cat}	12,6	-6,7	[2327]
	ZGlyGlyVal	k_{cat}	15,1	0	[2327]
Термолизин	FaGlyPheAla	k_{cat}	8,6	-22,9	[2460]
		k_{cat}/K_m	1,5	-26	[2460]
Нейтральная протеиназа <i>Bacillus subtilis</i>	FaGlyLeuAla	k_{cat}	3,8	-37,2	[2460]
		k_{cat}/K_m	5,7	-14,5	[2460]

* В трис-буфере.

** Калориметрические данные.

оба графика могут давать излом, так как при этом $k_{\text{cat}}/K_m = k_2 k_3 / K_s (k_{-2} + k_3)$, и в зависимости от соотношения k_3 и k_{-2} значения константы скорости второго порядка будут k_2/K_s или $k_2 k_3 / K_s k_{-2}$. Этот случай, по-видимому, наблюдается наиболее часто [1907, 2452, 2461, 2462, 2464].

Конформационные изменения, приводящие к изменению кинетических параметров ферментативной реакции, зарегистрированы в большом числе случаев (см.: [1661, 2449]). Различные конформеры имеют, как правило, сильно отличающиеся термодинамические характеристики связывания и превращения субстрата. Например [2452], химотрипсин изменяет свое состояние при гидролизе *n*-нитрофенил-ацетата, что проявляется в изломе графиков $\ln k_2 + 1/T$ (при 20,9° С) и $\ln K_s/k_2 + 1/T$ (при 20,1° С). Значения $\Delta H_2^\ddagger$ и $\Delta S_2^\ddagger$ при низких температурах составляют 20,5 ккал/моль и +13 е.е., а при высоких - 0,34 ккал/моль и -0,55 е.е. Активационные параметры деацилирования не зависят от температуры. Од-

нако для некоторых *n*-нитрофениловых эфиров 5-алкилфурил-2-карбоновых кислот зависимость $\ln k_3$ от $1/T$ нелинейна, тогда как для других не наблюдается излома на графиках Аррениуса [2462]. По гидролизу AcTrpOEt (при pH 8) переход между двумя формами α -химотрипсина (A_b и A_r) наблюдается при 25° С [2461]. У пепсина переход между состояниями был обнаружен при 34° С для гидролиза AcPheTyr [2465] и при 12° С для гидролиза ZLeuValPhe(NO₂)AlaArg [1907]. Таким образом, температура конформационного перехода может заметно зависеть от структуры субстрата.

Интересно сравнение параметров активации для термоустойчивого термолитина и близкой ему, но существенно более лабильной нейтральной протеазы *Bacillus subtilis*. Последняя имеет значительно большую энтальпию активации (по k_{cat}/K_m) и менее отрицательную энтропию, чем термолитин, что, по-видимому, связано с более "рыхлой" структурой нейтральной протеазы [2460].

Наконец, при больших величинах изменения удельной теплоемкости (ΔC_p) ΔH_o и ΔS_o являются нелинейными функциями температуры [2457, 2463, 2466], так как

$$\ln K_s = \Delta H_o \frac{1}{T} + \Delta S_o + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \ln T.$$

В связи с этим очевидны преимущества калориметрических измерений тепловых эффектов реакции при постоянной температуре. Такие определения для тепловых эффектов химических стадий очень немногочисленны (см., например: [2455]), и пока их трудно сравнивать с данными по температурной зависимости кинетических параметров. Значительно чаще калориметрические измерения используются для определения энтальпии и энтропии равновесных процессов (ассоциация фермента с субстратом или ингибитором) [2467, 2468]. При этом данные, полученные методом калориметрии и методом температурной зависимости констант диссоциации фермент-лигандных комплексов, также довольно сильно различаются. Это видно из сравнения параметров ΔH_o и ΔS_o , полученных для химотрипсина (табл. 57).

Таблица 57. Термодинамические параметры комплексообразования химотрипсина (pH 7,8)

Лиганд	Метод	ΔH_o , ккал/моль	ΔS_o , э.е.	Литературный источник
Профлавин	Кинетический	-8,0	-6	[2469]
	Калориметрический	-11,3	-18	[2468]
Ac-L-Trp	Кинетический	-9,06	-21	[2469]
	Калориметрический	-21,2	-61	[2468]
Ac-D-Trp	Кинетический	-10,0	-23	[2469]
	Калориметрический	-19,0	-52	[2468]

Интересно, что связывание перечисленных в табл. 57 лигандов модифицированными препаратами химотрипсина - N^ε2-метилгистидин-57- α -химотрипсином или ангидахимотрипсином - характеризуется примерно на 10 ккал/моль меньшей энтальпией и на 30 э.е. большим значением энтропии [2469]. Термодинамические параметры связывания в этих случаях близки к величинам, характерным для пе-

реноса ароматических соединений из воды в неполярную фазу ($\Delta H_0 \approx 0$). Сходные параметры наблюдаются для связывания гидрофобных соединений трипсином [2470] и связывания субстратов пепсином [1907].

Как и для каталитических констант, отмечаются случаи нелинейной зависимости констант связывания от температуры (см., например: [2471]).

Измерения зависимости каталитических констант амидгидролаз от давления сравнительно немногочисленны (см., например: [2460, 2472, 2473]). В качестве примеров можно указать на изменения объема связывания субстратов термолитином и нейтральной протеазой *Bacillus subtilis*, которые в случае первого, термостабильного фермента составляют $-20 \pm -30 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$, а во втором случае близки к нулю [2460]. Измерения $\Delta V^\ddagger$ гидролиза химотрипсином ди- и трипептид-*n*-нитроанилидов позволяют составить представление о числе водородных связей, образуемых субстратами в переходном состоянии, причем эти результаты хорошо согласуются с кристаллографическими данными [2335].

5.6.3. Компенсационный эффект

С эффектом компенсации мы уже сталкивались при рассмотрении специфичности субстратов химотрипсина. Это явление обнаруживается и при изучении многих других процессов [2450, 2474–2476].

Термодинамический компенсационный эффект заключается в линейной зависимости изменений энтальпии (ΔH_t) и энтропии (ΔS_t) в ряду сходных процессов, происходящих при постоянной температуре, т.е.

$$\Delta H_t = \alpha + T_C \Delta S_t, \quad (22)$$

где α и T_C – постоянные, причем T_C имеет размерность температуры и называется температурой компенсации. Из этого определения следует, что свободная энергия в ряду исследуемых превращений остается постоянной. Коэффициент $\alpha = \Delta H_t - T_C \Delta S_t$ и является изменением свободной энергии при температуре компенсации.

Компенсационный эффект обнаруживается при многих ферментативных реакциях, как, например, в случае катализируемого химотрипсином гидролиза этилового эфира ацетилтриптофана при разных pH (рис. 79) и многих других случаях.

Следует различать два типа компенсационных эффектов. Один, так называемый полный компенсационный эффект, имеет температуру компенсации, близкую к температуре эксперимента. Этот тип эффекта, по-видимому, является артефактом, обусловленным близкими значениями измеряемых параметров (констант равновесия и скорости) в относительно узком диапазоне температур и неизбежными при этом ошибками. Поскольку в этом случае измеряемая величина, например константа равновесия

$$K = e^{\frac{\Delta S_t}{R}} e^{-\frac{\Delta H_t}{RT}}, \quad (23)$$

является произведением двух сомножителей, то при $K \approx \text{const}$ всегда будет наблюдаться компенсация ΔS_t и ΔH_t .

Однако, есть компенсационные эффекты с температурой компенсации, не сов-

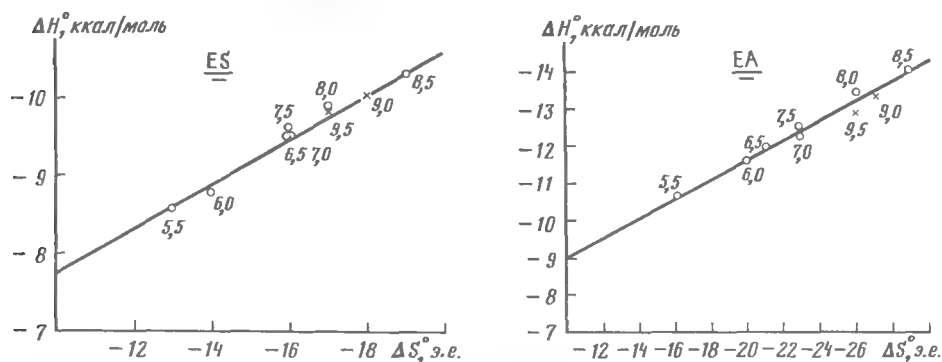


Рис.79. Компенсационные графики образования комплекса Михаэлиса (ES) и ацилфермента (EA) в ходе гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-триптофана α -химотрипсином при различных pH [2476]

падающей с температурой измерений и характеризующиеся малым разбросом точек. Существующие объяснения этих процессов [2476] связывают явление компенсации с изменением (деформированием и разрушением) структуры воды вблизи реагирующей макромолекулы. Эта точка зрения не разделяется другими исследователями, считающими, что компенсационные эффекты любого типа являются следствием "неправильного применения некоторых уравнений равновесной термодинамики" [2450, с.120]. Таким образом, природа компенсационного эффекта остается открытым вопросом.

5.6.4. Температурная устойчивость амидгидролаз.

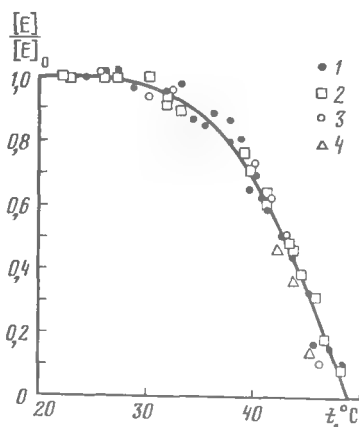
Термостабильные ферменты

Как уже указывалось, ферментативные реакции подчиняются уравнению Аррениуса (и другим термодинамическим зависимостям) в довольно узком интервале температур. Обычно при температурах, превышающих 40–45°C, наблюдается весьма резкое падение скорости реакции и увеличение констант диссоциации фермент-лигандных комплексов. Это обусловлено явлениями термической денатурации ферментов (рис.80) [2477,2478].

Здесь не будут рассматриваться проблемы денатурации белков, которым посвящены весьма полные обзоры [168,169,2479]. Остановимся лишь на некоторых

Рис.80. Изменение относительной концентрации нативного химотрипсина в зависимости от температуры (30 мин инкубации) [2478]

Определение по связыванию профлавина (1), начальной скорости гидролиза N-сукцинил-L-фенилаланил-p-нитроанилида (в условиях $[S]_0 \gg [E]_0$) (2), начальной скорости гидролиза p-нитрофенилацетата (3), изменению величины впадины на кривой ДОВ химотрипсина при 233 нм (4)



особых случаях, касающихся амидгидролаз. Температурная устойчивость большинства амидгидролаз животных ограничена указанным выше пределом в 40–45°C. Ферменты растений обычно несколько более устойчивы (температура денатурации около 50–60°C) [2480]. Известно довольно большое число амидгидролаз, продуцируемых термофильными микроорганизмами, устойчивость к температуре которых необычно высока (табл.58) [2481–2483].

Термостабильность металлсодержащих протеаз зависит от наличия металла в буферном растворе. Так, аминокептидаза *Bacillus stearothermophilicus*, устойчивая в растворах, содержащих ион Ca^{2+} , в отсутствие этого иона инактиви-

Таблица 58. Некоторые термостабильные амидгидролазы

Фермент	Источник	Температура инкубации, °C	Время инкубации, мин	Остаточная активность	Температурный оптимум, °C	Литературный источник
Кукумизин	Дыня <i>Cucumis melo</i>	70	10	~90	75	[436]
Нейтральная протеаза	<i>Bacillus subtilis</i>	50	15	100	57	[2486]
Термолизин	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	80	60	50	—	[1102]
α -Литическая протеаза	<i>Lysobacter</i> sp.	50	480	30	—	[2487]
Аминокептидаза	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	80	300	100	90	[1011]
"	<i>Telamomyces dupontii</i>	65	240	50	65	[1012]
Термомиколин	<i>Malbranchea pulchella</i>	73	110	50	—	[381]
Протеаза	<i>Aspergillus ochraceus</i>	55	10	90	40	[2488]
"	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	60	100	58	[2489]
"	<i>Cephalospor acremonas</i>	60	10	90	40	[2490]
"	<i>Melanocarpus albomyces</i>	60	20	100	55	[2491]
"	<i>Mucor pusillus</i>	55	15	100	55	[2492]
"	<i>Myriococcocus albomyces</i>	65	15	95	55	[2493]
"	<i>Pentotillium dupontii</i>	65	15	100	70	[2494]
"	<i>Pentotillium roquefortii</i>	80	20	90	50	[1113]
"	<i>Torula thermophila</i>	60	60	100	55	[2495]
Термитаза	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	55	120 (CaCl_2)	120	80	[394]

вируется при 80°C за 1 ч на 65% [1011]. Термолизин весьма устойчив в присутствии ионов Ca^{2+} [381]. Стабилизирующее действие на амидгидролазы оказывают многие ингибиторы, в том числе и субстратоподобные соединения [168, 2484], а также в некоторых случаях – АТР [2485].

Другая особенность инактивации, свойственная только протеолитическим ферментам, – это автолитическое расщепление, происходящее особенно эффективно при повышении температуры (см. разд.5.11).

Следует отметить, что до сих пор не существует общепризнанных представлений о причинах термостабильности некоторых белков, хотя в этом направлении ведутся обширные теоретические и экспериментальные исследования [2496–2500]. Два фактора, по-видимому, играют доминирующую роль – гидрофобные взаимодействия и конформационная энтропия разворачивания глобулы. Предпринимаются попытки увеличить стабильность ферментов методами направленного мутагенеза [2501].

Температурная устойчивость амидгидролаз и многих других ферментов может быть сильно увеличена при иммобилизации, т.е. химическом или сорбционном связывании с нерастворимым носителем (см. обзор: [2502]). В качестве примера укажем здесь лишь на иммобилизацию α -химотрипсина в структуре сшитого полиакриламидного геля. Удалось получить препарат фермента, выдерживающий длительное кипячение в воде [2503].

5.7. Криоэнзимология амидгидролаз

Если верхний предел температурной устойчивости ферментов удастся отодвинуть методами иммобилизации, то нижний предел, связанный с температурой замерзания растворов, можно преодолеть, используя смеси воды с органическими растворителями, имеющие низкую температуру замерзания. Эти методы, ставшие основой криоэнзимологии, подробно описаны в ряде обзоров и монографий [2421, 2504–2506].

Впервые исследование ферментативного гидролиза при отрицательных значениях температуры было предпринято в 1964 г. [2507] с использованием смесей метанол – вода. Дальнейшие обстоятельные исследования свойств различных смесей при низких температурах позволили рекомендовать условия, когда диэлектрическая проницаемость смеси соответствует величине, характерной для водных растворов при нормальной температуре [2421].

В криоэнзимологических исследованиях используются также концентрированные растворы NaCl [2508,2509], ацетата аммония [2510], а также полиэлектролиты [2511].

Объектами криоэнзимологических исследований были реакции, катализируемые химотрипсином [2512–2515], трипсином [2516–2519], папаином [2520–2522], карбоксипептидазой А [2508,2509,2523,2524], пепсином [2525], пенициллопепсином [2526], лейцинаминопептидазой [2527–2529] и β -лактамазами [2510, 2530].

Оказалось, во-первых, что зависимости каталитических констант от температуры во многих случаях подчиняются уравнению Аррениуса вплоть до температур порядка -50°C – -60°C . Во-вторых, при низких температурах удается существенно замедлить отдельные стадии процесса и таким образом идентифицировать

некоторые промежуточные соединения в катализе. Так, при pH 5,5 и -40°C в смеси диметилсульфоксид – вода (65:35) удается выделить ацилхимотрипсин, образующийся при гидролизе *n*-нитрофенилового эфира ацетилтриптофана [2512]. В то же время в случае пепсина, пенициллопепсина или лейцинаминопептидазы обнаружить ковалентные промежуточные соединения не удалось [2525–2527]. Было сообщено [2524] о прямом доказательстве образования промежуточного ангидрида в ходе катализа карбоксипептидазой А при низких температурах. Вместе с тем спектральные исследования [2508,2509] свидетельствуют скорее об отсутствии такого промежуточного соединения, но дают четкие доказательства образования второго фермент-субстратного комплекса (см. гл.6). Такое же двухстадийное комплексообразование обнаружено в случае лейцинаминопептидазы [2528,2529], а для трипсина зафиксирована изомеризация в каталитически менее активную форму [2518], а не образование тетраэдрического промежуточного соединения, как это предполагалось ранее [2531].

Криозэнзимологическая техника начинает получать применение и в рентгено-структурном анализе [2532–2534], позволяя в принципе изучать структуру комплексов ферментов с истинными субстратами, а также в ЯМР [2535].

5.8. Мицеллярная энзимология

В последнее время появились новые интересные возможности изучения ферментативных реакций при низких температурах [2516,2536]. Они заключаются в создании в органическом растворителе обращенных мицелл (рис.81). Это удастся сделать, вводя в систему поверхностно-активное вещество, например, *бис*-(2-этилгексил)-сульфосукцинат натрия [2536] или лецитин [2537].

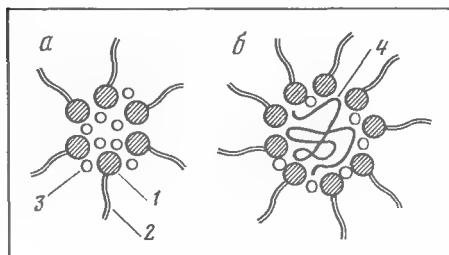


Рис.81. Схематическое изображение обращенной мицеллы поверхностно-активного вещества (ПАВ) в органическом растворителе (а) и фермента, включенного в мицеллу (б)

1- ионная (полярная); 2- углеводородная группа в молекуле ПАВ;
3- противоионы или сольбилизованные молекулы воды; 4- молекула фермента

Основные принципы мицеллярного катализа изложены в разд.3.4.9. Реакции в мицеллах широко используются при обычных температурах (см. обзор: [1631] и цит. лит.). Каталитическая активность в этих условиях зависит от соотношения вода/поверхностно-активное вещество, проходя через максимум. В максимум создается оптимальное соотношение между диаметром внутренней полости и размером белковой молекулы. Эффективность катализа по сравнению с водными растворами сильно снижается для более специфичных субстратов, чем для простых производных ациламинокислот [2538].

Достоинствами обращенных мицелл являются оптическая прозрачность растворов, их низкая вязкость и низкие температуры замерзания.

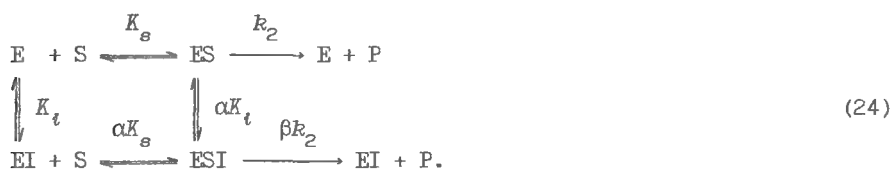
5.9. Ингибиторы

В этом разделе будет рассмотрено действие на амидгидролазы органических веществ, подавляющих каталитическую активность ферментов. Действие неорганических ионов было рассмотрено в разд.5.3.

5.9.1. Кинетика ингибирования

Все ингибиторы можно разделить на две большие группы – обратимые и необратимые. Первые обычно образуют с ферментом нековалентные связи, и их действие может быть обращено, например, разбавлением смеси или отделением ингибитора гель-фильтрацией. Вторые реагируют с ферментом, образуя ковалентные связи, и их действие такими простыми приемами обратить не удастся. Известны, однако, случаи, когда вещество, связывающееся нековалентно, очень трудно отделить от белка и, наоборот, ковалентная связь разрушается достаточно легко.

Обратимый ингибитор может взаимодействовать как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом (см. обзоры: [1661,2425]):



Общее выражение для скорости реакции, соответствующее кинетической схеме (24), будет:

$$v = \frac{k_2 \frac{\alpha K_i + \beta [I]_0}{\alpha K_i + [I]_0} [E]_0 [S]_0}{\frac{K_t + [I]_0}{\alpha K_s} + [S]_0} \quad (25)$$

Тип ингибирования определяется численными значениями коэффициентов α и β [2539].

Полное конкурентное ингибирование характеризуется значениями $\alpha \rightarrow \infty$, причем β не имеет физического смысла. В этом случае уравнение (25) трансформируется в:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{[I]_0 + K_t \left(1 + \frac{[S]_0}{K_s}\right)} \quad (26)$$

Определение величины K_t чаще всего проводят по методу Диксона [1661], строя зависимость $1/v$ от $[I]_0$ при нескольких значениях $[S]_0$, или же из зависимости $1/v + 1/[S]_0$ при нескольких значениях $[I]_0$ (рис.82).

Полное неконкурентное ингибирование ($\alpha=1, \beta=0$) описывается уравнением

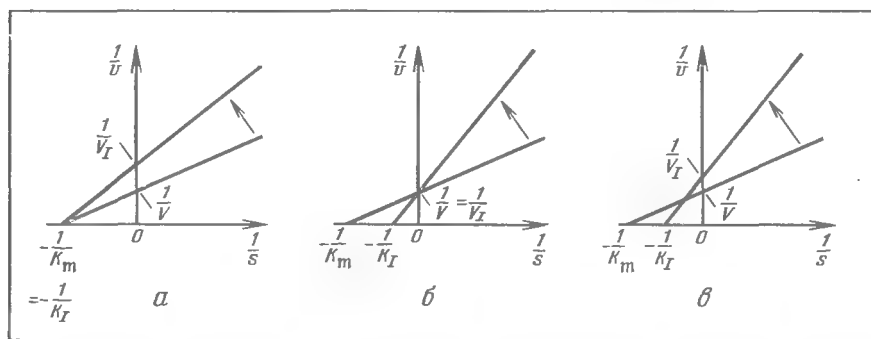


Рис. 82. Определение константы ингибирования методом Лайнуивера и Берка а- неконкурентное торможение; б- конкурентное торможение; в- торможение смешанного типа

скорости:

$$v = \frac{k_2 / (1 + [I]_0 / K_t) [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0}. \quad (27)$$

Значение K_t находят теми же способами, что и в случае конкурентного ингибирования.

Смешанное ингибирование (α и $\beta \neq 1$). В этом случае координаты точек пересечения графиков $1/v + 1/[S]_0$ даются выражениями [2539], не зависящими от K_t :

$$\frac{1}{[S]_0} = \frac{1}{K_s} \cdot \frac{\beta - 1}{\alpha - \beta}, \quad (28)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta}. \quad (29)$$

Зная K_s и $V_{\max}$ из опыта в отсутствие ингибитора, можно найти α и β , решая совместно уравнения (28) и (29).

Другой способ, позволяющий найти значения α , β и K_t , заключается в преобразовании значений k_{cat} и K'_m в уравнении (25) к виду:

$$\frac{1}{k_{\text{cat}} / (k_2 - 1)} = \frac{\alpha K_t}{\beta - 1} \cdot \frac{1}{[I]_0} + \frac{1}{\beta - 1}, \quad (30)$$

$$\frac{1}{K'_m / (K_s - 1)} = \frac{\alpha K_t}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{[I]_0} + \frac{1}{\alpha - 1}. \quad (31)$$

Из этих двух графиков можно найти все три константы.

Ингибирование субстратом было рассмотрено в разд. 4.1.6.

Ингибирование продуктом реакции анализируется обычно при больших степенях превращения субстрата, когда условие стационарности не соблюдается. Поэтому, для кинетической схемы



используют интегральное выражение для скорости:

$$\frac{[P]}{t} = \frac{V_{\text{max}}}{1 - K_s/K_P} - \frac{K_s(1 + [S]_0/K_P)}{t(1 - K_s/K_P)} \cdot \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}. \quad (33)$$

Строя графики зависимости $[P]/t$ от $1/t \cdot \ln([S]_0/[S]_0 - [P])$ при разных $[S]_0$ и откладывая на вторичном графике обратные величины отсекаемых на оси абсцисс отрезков от $[S]_0$, можно определить величину K_P . Часто ингибирование продуктом изучают как обычное обратимое ингибирование, вводя в реакционную смесь различные количества продукта и измеряя начальные скорости реакции. Анализ схем ингибирования для многосубстратных реакций дан в работе [2540].

В тех случаях, когда сродство ингибитора к ферменту очень велико, используемые в опытах по определению K_t концентрации фермента и ингибитора оказываются сравнимыми, и допущение, лежащее в основе выводов выражений для ингибирования о постоянстве концентрации ингибитора ($[I] \gg [EI]$), неприменимо. В этом случае для неконкурентного торможения можно определить величину K_t из уравнения [2541]:

$$\frac{[I]_0}{1-\alpha} = K_t \cdot \frac{1}{\alpha} + [E]_0,$$

где $\alpha = v/v_t$, т.е. отношение скорости в присутствии ингибитора к скорости в его отсутствие. Наклон графика в координатах $[I]_0/(1-\alpha)$ от $1/\alpha$ будет равен K_t . Известны и другие типы анализа таких систем [2425, с.80; 2542].

Сложные случаи смешанных типов ингибирования предложено [2543] анализировать методом векторной K'_m - V'_{max} -системы координат. В этом случае строят зависимости кажущихся значений K'_m и V'_{max} для разных концентраций ингибитора и по положению и величине получающейся прямой (вектора) судят о типе ингибирования. Этот же метод можно использовать для исследования активации ферментов.

Часто бывает полезно проанализировать взаимные отношения двух ингибиторов одного и того же фермента. Два ингибитора будут взаимонезависимыми, если они могут одновременно связываться с активным центром фермента. Взаимозависимые ингибиторы вытесняют один другого [2544]. Различать эти типы ингибирования можно, строя графики v/v_t от $[I_1]_0$ при постоянной концентрации второго ингибитора (рис.83). Для случая взаимозависимого ингибирования

$$v/v_t = 1 + \frac{[I_2]_0}{(K_t)_2} + \frac{[I_1]_0}{(K_t)_1},$$

а для взаимонезависимых ингибиторов

$$v/v_t = \left(1 + \frac{[I_1]_0}{(K_t)_1}\right) \left(1 + \frac{[I_2]_0}{(K_t)_2}\right).$$

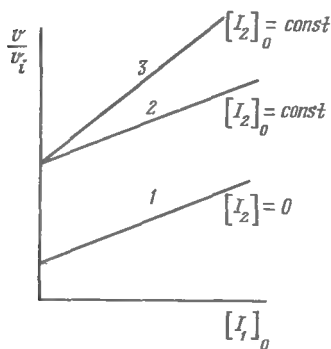


Рис.83. Определение взаимной зависимости действия двух ингибиторов на ферментативную реакцию

1- отсутствие второго ингибитора;
2- взаимозависимое и
3- взаимонезависимое действие второго ингибитора

Необратимое ингибирование. Необходимо различать два типа необратимых ингибиторов: не обладающие сродством к ферменту и обладающие сродством (аффинные) ингибиторы. В первом случае реакция ингибитора с ферментом описывается как реакция второго порядка или, если ингибитор берется в большом избытке, как реакция псевдопервого порядка (см. обзор: [2545]).

В случае аффинных ингибиторов последний сначала образует комплекс с ферментом, и затем фермент-ингибиторный комплекс превращается в необратимо ин- активированный фермент:



В том случае, когда равновесие устанавливается быстрее, чем происходит химическая инактивация, скорость изменения активности фермента описывается уравнением (35), аналогичным уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$v = - \frac{d[E]}{dt} = \frac{k_t[E]_0[I]_0}{K_t + [I]_0}. \quad (35)$$

Определить k_t и K_t можно, измерив начальные скорости инактивации при различных концентрациях $[I]_0$ и строя график $1/k_{\text{эксп}}$ от $1/[I]_0$, где $k_{\text{эксп}} = k_t[I]_0 / K_t + [I]_0$ [2546]. Анализ теории и методов определения констант скорости необратимого ингибирования дан в работах [2547, 2548].

Предложено также несколько способов определения числа функционально важных остатков фермента из данных по их химической модификации [2549-2551]. Так, согласно [2550], доля остаточной активности фермента (α) и число важных для активности остатков (l) связаны выражением:

$$\alpha^{1/t} = \frac{N}{P} \cdot \chi - \frac{N - (P + S)}{P},$$

где N - общее число остатков данного типа в белке, P - число медленно модифицируемых остатков, среди которых l остатков важны для активности, и S - число быстро модифицируемых остатков, несущественных для активности.

5.9.2. Неспецифические ингибиторы

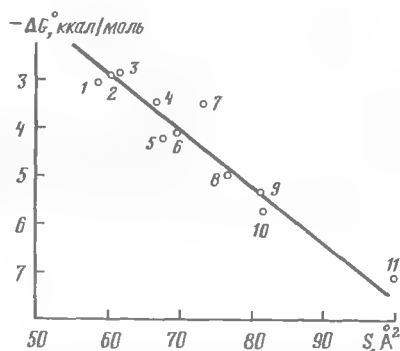
Большую группу органических соединений, подавляющих активность амидгидролаз, можно назвать неспецифическими ингибиторами, поскольку их строение су-

щественно отличается от строения субстратов, а их действие обусловлено некоторыми общими для них физико-химическими свойствами. Эти ингибиторы могут подавлять активность очень многих амидгидролаз, активные центры которых проявляют гидрофобные свойства или несут заряд. Как и многие другие проблемы химии амидгидролаз, их ингибирование наиболее подробно изучено на примере сериновых протеаз – химотрипсина, трипсина, эластазы и др.

К неспецифическим ингибиторам можно в первую очередь отнести ароматические соединения, действие которых на химотрипсин было подробно исследовано еще в 1963 г. [2552]. Было испытано 130 соединений, относящихся к производным бензола, пиридина, нафталина и др. Все эти соединения характеризуются константой ингибирования химотрипсинового катализа порядка $1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-3}$ М. Связывание циклогексанола заметно слабее ($K_i = 29$ мМ [2553]) по сравнению с фенолом ($K_i = 3,5$ мМ [2554]), что указывает на плоский характер связывающего участка фермента.

Рис.84. Зависимость свободной энергии комплексообразования ароматических соединений с химотрипсином от площади их поверхности [2413,2555]

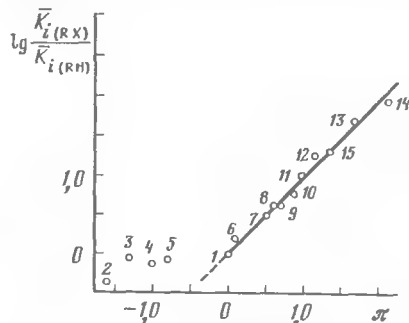
1- пентан; 2- бензол; 3- циклогексан;
4- толуол; 5- хлорбензол;
6- нитробензол; 7- этилбензол;
8- инден; 9- нафталин; 10- азулен;
11- антрацен



Существует определенная зависимость между площадью поверхности ингибитора и прочностью образования фермент-субстратного комплекса (рис.84) [2413, 2555], однако важнейшую роль в связывании играет их гидрофобность (рис.85) [2554,2556]. Полярные заместители в ароматических соединениях очень мало влияют на эффективность комплексообразования. По-видимому, фермент "экстрагирует" лишь гидрофобный остов молекулы, тогда как полярные участки остаются

Рис.85. Зависимость относительных констант ассоциации производных фенола ($\text{RC}_6\text{H}_4\text{OH}$) от гидрофобности заместителя

Заместитель (R): Н (1), 4- NH_2 (2),
4- CONH_2 (3), 4-ОН (4), 3-ОН (5),
3-ОМе (6), 4-Ме (7), 3-Ме (8), 2-Сl (9),
2-Br (10), 4-Cl (11), 4-Br (12),
2,4-Cl (13), 2,4-Br (14), β -нафтол (15)



я гидратированными. Аналогичные зависимости наблюдаются для алифатических спиртов [2553,2556] и других соединений. Связывание спиртов характеризуется значительным положительным изменением энтропии системы [2556,2557].

Ферменты, в комплексообразовании с которыми важную роль играют электростатические взаимодействия, эффективно ингибируются органическими соединениями, содержащими заряженную группировку. Это видно, например, из данных по ингибированию такими соединениями трипсина и ряда трипсиноподобных протеаз [2558,2559] (табл.59).

Таблица 59. Ингибирование трипсиноподобных ферментов амидинами [2558]

Фермент	K_i , мкМ		Фермент	K_i , мкМ	
	Бенза- мидин	5-Амидино- индол		Бенза- мидин	5-Амидино- индол
Трипсин быка	35,2	29,1	Калликреин	933	1,2
Тромбин быка	332	7,7	Акрозин	4,0	0,5
Тромбин человека	235	7,9	Плазмин	207	112
Фактор X_a человека	182	5,45			

Особую группу ингибиторов составляют некоторые красители, эффективно связывающиеся с рядом протеолитических ферментов (табл.60).

Особенностью этих соединений является значительное изменение спектров поглощения или флуоресценции при связывании с ферментом. Этот спектральный сдвиг трактовался [2567] как следствие изменения диэлектрической проницаемости среды при комплексообразовании красителя с белком, причем свойства активного центра химотрипсина в этом отношении близки к свойствам циклогексана. Однако спектральный сдвиг красителя, по-видимому, определяется не столько диэлектрической проницаемостью, сколько показателем преломления среды [2568].

Таблица 60. Красители - ингибиторы протеаз

Краситель	Фермент	K_i , М	$\lambda_{\max}$ комплекса	Литера- турный источник
Профлавин	Химотрипсин	$2,5 \cdot 10^{-5}$	465	[2560, 2561]
"	Трипсин	$3,4 \cdot 10^{-5}$	469	[2560]
Тионин	"	$45 \cdot 10^{-5}$	625	[2560]
"	"	$3,4 \cdot 10^{-5}$	622	[2562]
Акрифлавин	Пепсин	$6 \cdot 10^{-4}$;	476	[2563]
"	"	$1,2 \cdot 10^{-4}$		
Бриллиантовый зеленый	Химотрипсин	—	420; 625	[2564]
Родамин 6G	"	$0,8 \cdot 10^{-5}$	542	[2565]
Пурпурный Бисбери	"	—	420; 625	[2566]

Неспецифическому ингибированию подвержены не только сериновые протеазы, но и представители всех других групп амидгидролаз. Так, диоксан [2336], спирты [2569], фенолы и другие ароматические и циклоалифатические соединения ингибируют активность пепсина. Спирты подавляют активность лейцинаминопептидазы [2570], причем их эффективность коррелирует с длиной алифатической цепи.

Хелатирующие агенты также можно рассматривать как неспецифические инги-

биторы металлсодержащих амидгидролаз, поскольку их ингибирующая способность определяется общим для них свойством связывать ионы тяжелых металлов [2389, 2486, 2571].

Одновалентные катионы в ряде случаев способны подавлять активность протеолитических ферментов. Так, отмечено подавление активности glandулярного калликреина ионами Na^+ и K^+ в физиологических концентрациях [2572], а также ингибирование этими ионами активности мультикалалитических протеиназ (протеосом) [2573].

Тип ингибирования зависит не только от структуры ингибитора, но иногда и от структуры субстрата. В качестве примера можно отметить [2574], что ингибирование пепсина этанолом носит чисто конкурентный характер в отношении гидролиза $\text{ZPhe}(\text{NO}_2)\text{AlaArp}$ и чисто неконкурентный характер в отношении гидролиза $\text{ZAlaPhe}(\text{NO}_2)\text{Arp}$.

Связывание ингибиторов во многих случаях приводит к конформационным перестройкам в белке, что проявляется в изменениях их спектральных и других физико-химических свойств [1375], в изменении pK_a ионогенных групп, сопровождающемся связыванием или отщеплением протона [2575-2577], а также в большей устойчивости комплексов ферментов с некоторыми ингибиторами к денатурации по сравнению со свободными белками [2578, 2579].

Связывание ингибиторов зависит также от олигомерного состояния фермента [2580].

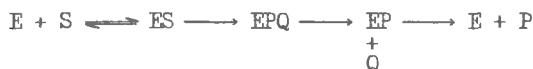
5.9.3. Специфические обратимые ингибиторы

К этому типу ингибиторов можно отнести субстраты, продукты ферментативной реакции и их аналоги.

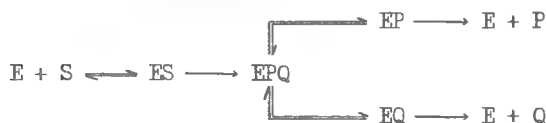
Ингибирование субстратами подробно исследовано на примере карбоксипептидазы А [1738, 2581-2583]. Кинетическая схема катализа этим ферментом описывается схемой (37), а скорость реакции - уравнением (38) (см. разд. 4.1.6).

При низких концентрациях субстрата реакция подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. При увеличении $[\text{S}]_0$ с ферментом связывается вторая молекула субстрата, активируя процесс гидролиза ($\beta > 1$), и, наконец, дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводит к связыванию третьей молекулы, которая ингибирует фермент. Значение β для разных субстратов варьирует в пределах от 2 до 4,5, а величины K'_s примерно на порядок выше значений K_s . Ингибирование характеризуется константой K''_s порядка 17-30 мМ, за исключением ZGlyPhe , для которого $K''_s = 0,3 \text{ М}$ [1738]. Интересно отметить, что ацетилирование карбоксипептидазы N-ацетилимидазолом лишает фермент способности ингибироваться субстратом [2584].

Продукты гидролиза, как правило, ингибируют ферменты. Анализ типа ингибирования продуктом позволяет сделать важные выводы о механизме ферментативной реакции [2585]. Однако на этом пути встречаются довольно большие сложности. Так, было показано [2175, 2585, 2586], что при гидролизе соединений типа AcPhePheOMe , катализируемом пепсином, ацильный фрагмент (AcPheOH) проявляет свойства неконкурентного ингибитора, тогда как второй продукт (HPheOMe) является конкурентным ингибитором (при $\text{pH } 2$). Отсюда был сделан вывод об упорядоченном отщеплении продуктов из комплекса с ферментом



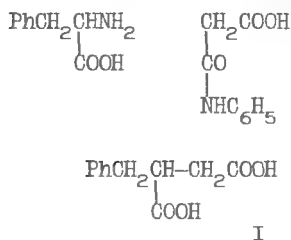
(где $P=HPhеОМе$ и $Q=AcPhеОН$) и о существовании промежуточного аминфермента, которому приписывалась ковалентная природа. При $pH \approx 4$ наблюдается конкурентное ингибирование ацетилфенилаланином, что указывало на неупорядоченный механизм при повышении pH :



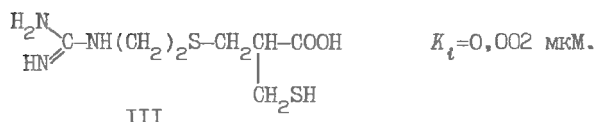
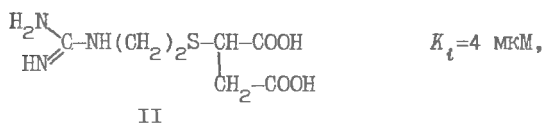
Противоположные результаты были получены [2587] по ингибированию ацетилфенилаланином катализируемого пепсином гидролиза $AcPhеTyr$ в области pH 2÷4,5. На основании полученных данных постулировался упорядоченный механизм при низких pH и переход к неупорядоченному по мере ионизации группы с $pK_a \approx 3$.

Наконец, было показано [2588], что различия в типе ингибирования могут возникать, если ингибитор связывается не только со свободным ферментом, но и с фермент-субстратным комплексом. Таким образом, по крайней мере в случае пепсина, результаты ингибирования продуктом не позволяют ответить на вопрос об упорядоченности механизма гидролиза.

Весьма эффективные ингибиторы получаются, если объединить в одной структуре оба продукта ферментативного гидролиза (так называемые bi-product analogues). Например, *L*-бензилсукцинат (I) ингибирует карбоксипептидазу с $K_t = 0,45$ мкМ [2589], частично воспроизводя структуру гипшуровой кислоты и фенилаланина:



Соединения (II) и (III) оказались чрезвычайно эффективными ингибиторами карбоксипептидаз В и N соответственно [2590,2591]:



Сходного типа ингибиторы были предложены [2592] для ряда сериновых протеаз группы трипсина (плазмин, калликреин, тромбин и др.), а также для некоторых металлосодержащих протеаз [2593,2594].

Очень большое число работ посвящено исследованию ингибирующего действия аналогов субстратов. Сравнение констант ингибирования химотрипсина амидами и эфирами ацетил-*D*-аминокислот показало очень небольшие отличия в K_i амидов и эфиров, тогда как K'_m соответствующих субстратов различаются весьма значительно, причем K_i и K'_m амидов весьма близки [1666]. В случае эфиров между K_i и K'_m наблюдается заметное отличие. Отсюда следует, что K'_m амидов совпадает с K_s - константой диссоциации комплекса Михаэлиса. В случае же эфиров K'_m - эффективная константа. Равенство K'_m и K_s имеет место и при пепсиновом катализе [2338,2444,2595]. В случае пепсина K_i лишь нейтральных ингибиторов не зависит от pH [2338], однако, например, в термолизине такой зависимости нет и для заряженных субстратов [2596].

В большинстве случаев ингибирующая способность аналогов субстратов протеаз определяется не только первичной, но в значительной мере и вторичной специфичностью, т.е. структурой групп, удаленных от расщепляемой в соответствующем субстрате связи [2597-2602]. В этом отношении интересным примером является ингибирование катепсина D и пепсина пептидами, содержащими обычно расщепляемую этими ферментами связь PhePhe (табл.61).

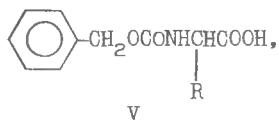
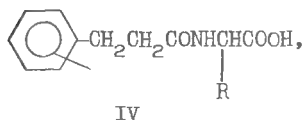
Таблица 61. Ингибирование катепсина D и пепсина [2601]

Ингибитор	K_i , мкМ	
	Катепсин D	Пепсин
pGlu-D-PheProPhePheVal-D-Leu	0,031	0,47
D-PheProPhePheVal-D-Leu	0,52	5,2
D-PhePro-D-Phe-D-PheVal-D-Leu	650	-
D-PheProPhePheVal	Не ингибирует	

Как видно, наиболее эффективно ингибирующее действие проявляется при *L-L*-конфигурации аминокислот, образующих потенциально расщепляемую связь, тогда как *D-D*-энантиомер ингибирует катепсин D примерно в $\sim 10^3$ хуже.

Однако в случае α -химотрипсина структура и конфигурация вторичных аминокислотных остатков вносят незначительные изменения в константу ингибирования [2597,2599]. Был отмечен различный тип ингибирования гидролиза химотрипсином *n*-нитроанилида сукцинилфенилаланина и трипептидного субстрата ValTyrGly ингибитором GlyTyr-D-Ala [2597].

Влияние вторичных взаимодействий прослеживается и на сериях весьма сходных ингибиторов термолизина [2603]:

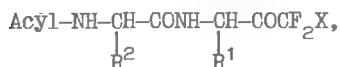


где $R=H$, CH_3 , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH(CH_3)CH_2CH_3$.

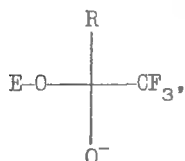
Если значения K_i соединений IV коррелируют с гидрофобностью группы R ($\lg K_i = -0,737\pi - 1,8$), то для ингибиторов типа V наблюдается корреляция не с гидрофобностью, а со стерическими эффектами этой группы ($\lg K_i = 0,88E_s - 3,086$). По-видимому, эти соединения, отличающиеся лишь заменой группы CH_2 на O-атом, по-разному связываются в активном центре фермента. Замена NH -группы в P_1 -остатке субстратов пепсина на атом кислорода [1990] или замена CO -группы на CH_2 -группу в P_1' -остатке таких субстратов [2604] превращает их в конкурентные ингибиторы ферментов, причем значения K_i оказываются весьма близкими значениям K_m' .

Очень сходные ферменты также могут проявлять совершенно разную чувствительность по отношению к ингибиторам. Так, $m\text{-CF}_3C_6H_4COAlaAla\text{-}n\text{-NA}$ ингибирует эластазу лейкоцитов с $K_i = 4 \cdot 10^{-6}$ М, но не действует на панкреатическую эластазу [2605].

Большую группу весьма эффективных ингибиторов сериновых протеаз составляют фторированные пептидкетоны [2606-2608] типа:



где R^1 и R^2 - остатки специфических для положений S_1 - и S_2 -связывающих участков фермента аминокислот, а X - атом фтора или цепь, специфичная в отношении S' -связывающих участков. Большинство таких ингибиторов медленно, но очень прочно ($K_i \sim 1 \cdot 10^{-9}$ М) связывается в активном центре, образуя с сериновым гидроксилом полукетали:



т.е. сходны с так называемыми аналогами переходного состояния (см. разд. 5.9.7). Аналогичного типа ингибиторы были предложены для аспартатной протеазы ренина [2609].

Таковыми же "псевдонезобратимыми" ингибиторами цистеиновых протеаз являются пептидонитрилы, например AcPheLeuC=N ($K_i = 5,8 \cdot 10^{-6}$ М), образующие с SH-группой фермента промежуточные соединения типа $R-C(-NH)-S-E$ [2610].

Обратимые ингибиторы ренина и других аспартатных протеаз на основе восстановленных по расщепляемой группе субстратов (VI) и (VII) также оказались весьма эффективными [2611-2614]:



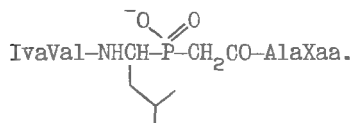
VI

VII

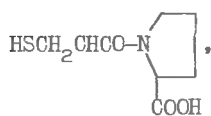
Сходного типа ингибиторы подавляют активность коллагеназы и некоторых

металлсодержащих протеиназ [2615-2617].

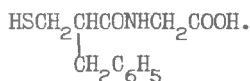
Выдающейся эффективностью ($K_i \approx 7 \cdot 10^{-11}$ М) обладают аналоги субстратов аспартатных протеаз на основе фосфиновых кислот [2618], например:



На основе данных о строении некоторых протеаз удалось разработать весьма эффективные ингибиторы металлсодержащих ферментов. Их действие основано на введении в молекулу группировки, образующей координационную связь с атомом металла [2619-2631]. Среди них наиболее эффективными и широко используемыми являются каптоприл (VIII) и тиорфан (IX):



VIII



IX

Каптоприл используется для подавления дипептидилкарбокси-peптидазы (ангиотензинпревращающего фермента) *in vivo*. Этот же фермент подавляется с $K_i = 4,5 \cdot 10^{-12}$ М аналогом субстрата - [дез-Pro³]-брадикинином [2632].

Специфические субстратоподобные ингибиторы, содержащие в своем составе группировку красителя (дансильную, акридиновую и др.), широко используются для введения обратимых репортерных групп в амидгидролазы [1881, 2633-2635].

5.9.4. Необратимые группоспецифические ингибиторы

С представителями этой группы ингибиторов мы уже встречались (см. разд. 2.6). Здесь они будут рассмотрены несколько подробнее. Сведения о многих из них можно найти в обзорах [2545, 2636-2638].

Сериновые амидгидролазы. Важнейшими группоспецифическими ингибиторами сериновых амидгидролаз являются производные фосфорной кислоты, некоторые хлорметилкетоны и сульфонилфториды.

Производные фосфорной кислоты общей формулы



реагируют с сериновыми ферментами, фосфорилируя каталитически активный остаток серина (в химотрипсине Ser195). Наиболее известный ингибитор - это диизопропилфторфосфат ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{изо-Pr}$, $\text{X}=\text{F}$) [1308]. Ранние работы по действию ингибиторов этого типа суммированы в обзоре [175]. В качестве группы X, кроме атома галлоида, может быть фосфоэфирная [2639, 2640] или фосфотиоэфирная [2641] и другие [2642, 2643] группы. Реакция диизопропилфторфосфата с химотрипсином происходит с константой скорости $k=2,7 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$. Трипсин

реагирует с этим веществом заметно медленнее ($k=0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) [2284]. Эти скорости на 4–5 порядков выше, чем скорость реакции с модельным соединением – N-ацетил-L-тирозинамидом. Для различных алкилфосфатов были найдены структурно-функциональные корреляции ингибирующих свойств [2644, 2645]. Фосфоэфирная группа может быть удалена обработкой гидроксиламином и другими нуклеофильными агентами с частичным восстановлением активности фермента [2646, 2647].

Остаток серина селективно реагирует также с фенилметансульфонилгалогенидами [2648–2650] и дифенилкарбамоилхлоридом [2651], однако не все сериновые амидгидролазы в одинаковой степени чувствительны к алкилфосфатам и к этим последним необратимым ингибиторам.

Весьма широко и подробно исследовано действие на сериновые амидгидролазы хлоркетонов – производных аминокислот и пептидов (табл. 62; ранние работы см. в: [2652]).

Хлоркетоны – производные аминокислот реагируют с атомом $\text{N}^{\epsilon 2}$ каталитически активного остатка гистидина (His57 в химотрипсине) [2660, 2661], хотя

Таблица 62. Константы скорости реакции хлоркетонов с амидгидролазами

Фермент	Ингибитор	$k_t/[I]_0$, $\text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$ (схема 34)	Литературный источник
Химотрипсин	ZPheCH ₂ Cl*	73 (pH 7,0)	[2653]
"	ZGlyLeuPheCH ₂ Cl	3,0 (pH 5,8)	[2654]
Трипсин	TosLysCH ₂ Cl*	7,0	[2653]
"	D-ValPheLysCH ₂ Cl	$1,08 \cdot 10^4$ **	[2655]
Эластаза панкреатическая	ZPheCH ₂ Cl	0,05	[2653]
То же	Suc(Ala) ₂ ProValCH ₂ Cl	73	[2654]
"	Tfa(Ala) ₂ AlaCH ₂ Cl	60	[2656]
Эластаза лейкоцитарная	MeOSuc(Ala) ₂ ProValCH ₂ Cl	922	[2654]
Катепсин G	ZGlyLeuPheCH ₂ Cl	260	[2654]
Плазмин	D-ValPheLysCH ₂ Cl	$2,38 \cdot 10^4$ **	[2655]
Тромбин человека	D-ValLeuLysCH ₂ Cl	$2,54 \cdot 10^4$ *	[2655]
Фактор Ха быка	D-ValPheLysCH ₂ Cl	117**	[2655]
Калликреин	ProPheArgCH ₂ Cl	$7,48 \cdot 10^4$ **	[2657]
Постпролиновая протеаза	ZGlyGlyProCH ₂ Cl	109	[2653]
Энкефалиназа	TyrGlyGlyPheLeuCH ₂ Cl	(16 нМ)***	[2658]
Химаза кожи человека	ZPheCH ₂ Cl	18,3	[2659]

* Не являются группоспецифическими ингибиторами; реагируют с папаином с $k_t/[I]_0$, равной 50 (ZPheCH₂Cl) и 46 (TosLysCH₂Cl) [2653].

** Значения k_t/K_i в $\text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$

*** IC₅₀ по сокращению гладкой мускулатуры (морские свинки).

имеются данные и об алкилировании других остатков, в частности Met192 [2662]. Эти реагенты являются удобным средством введения репортерных меток в активные центры сериновых протеаз [2663].

Реакция хлоркетонов с ферментами следует кинетической схеме (34) с образованием промежуточного фермент-ингибиторного комплекса (с модельным соединением ацетилгистидином хлоркетоны реагируют на ≈ 6 порядков медленнее [2664]).

Кроме хлоркетонов с ферментами этой группы реагируют другие производные пептидилкетонов типа $R-COCH_2X$ ($X = COCH_3, OCOCH_3, F$ и др.), причем эффективность ингибирования связана с индукционной постоянной σ_1 группы X линейным соотношением [2665]:

$$-\log K_i = 7,2\sigma_1 + 2,1.$$

Реакция с галогидметилкетонами идет, по-видимому, через образование гемикетала с сериновым гидроксилом фермента и с последующим внутримолекулярным алкилированием остатка гистидина [2665,2666].

Следует отметить, что хлорметилкетоны реагируют и с тиоловыми группами [2667] и поэтому способны инактивировать цистеиновые амидгидролазы. Следовательно, использование их как единственных группоспецифических ингибиторов не дает однозначных сведений о природе модифицированного фермента.

Фторметилкетоны медленнее реагируют с сериновыми и цистеиновыми протеазами, чем соответствующие хлорметилкетоны [2668,2669]. Фторкетоны быстрее, чем хлоркетоны образуют гидратную форму, но медленнее реагируют с группами активного центра [2670]. По-видимому, эти ингибиторы связываются с ферментом в keto-, а не в гидратной форме и лишь в активном центре происходит образование полукетала.

Эффективными ингибиторами сериновых протеаз являются α -бромацетамиды, производные ароматических аминов [2671]. Так, бромацетилизоиндолин реагирует с метионином активного центра химотрипсина с константой скорости второго порядка $k_i/K_i = 147 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$.

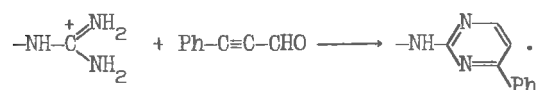
Предложены также сульфонаты типа [2672]:



реагирующие с сериновыми протеиназами с отщеплением бисульфита, и алкиниловые эфиры ароматических кислот [2673]:

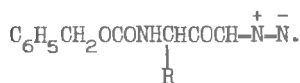


В качестве специфического необратимого ингибитора β -лактамазы предложен [2674] фенилпропиналь, реагирующий с остатками аргинина и лизина:

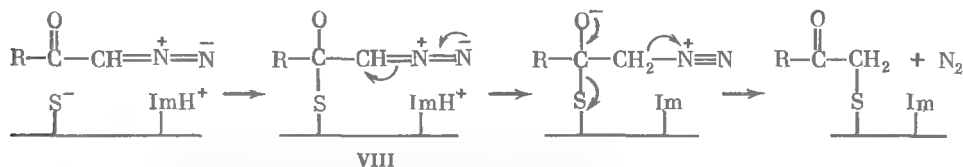


Цистеиновые амидгидролазы. Кроме хлорметилкетонов, производных аминокислот и пептидов, с SH-группой многих цистеиновых амидгидролаз реагируют диа-

зометилкетоны типа [2675-2677]:

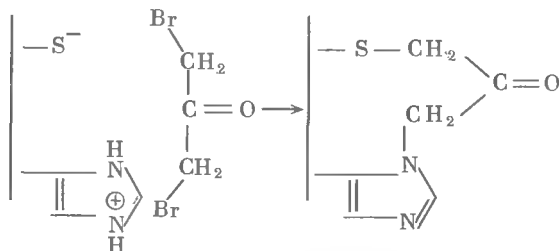


В отличие от хлоркетонов, скорость реакции которых с SH-группой увеличивается с увеличением pH, диазометилкетоны наиболее эффективно реагируют при низких значениях pH. Отсюда был сделан вывод [2675], что эти реагенты атакуют незаряженную сульфгидрильную группу. Однако затем было показано [2678], что наблюдаемая pH-зависимость реакции может быть объяснена лимитирующим скорость протонированием промежуточного тиогемиацетала (VIII) с последующей трехцентровой перегруппировкой:

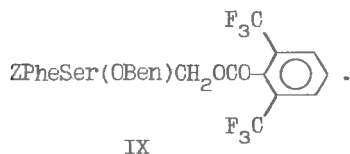


Реакция диазометилкетонов с цистеиновыми амидгидролазами происходит по схеме (34) (см. разд. 5.9.1) весьма эффективно. Так, константа скорости второго порядка реакции катепсина В с ZPheAlaCHN₂ $k_t/K_t=7,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ [2679], а с ZPheTrpCHN₂ $-8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ [2680]. Эти соединения не реагируют с низкомолекулярными тиолами.

К группоспецифическим ингибиторам тиоловых протеаз можно отнести 1,3-дибромацетон, реагирующий одновременно с SH-группой и остатком гистидина активного центра [2681]:

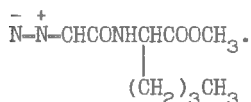


Известен и ряд других специфических необратимых ингибиторов цистеиновых протеаз [2682-2684]. Среди них особой эффективностью обладает соединение (IX), реагирующее с катепсином В с константой скорости $k_t/K_t=2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ [2682]:



Аспартатные амидгидролазы. В 1965 г. было обнаружено [1340], что дифенилдиазометан этерифицирует 2-3 карбоксильные группы пепсина с частичной потерей каталитической активности фермента. Поиск более специфических ди-

азосоединений привел к получению большого числа реагентов, специфически ингибирующих аспартатные протеазы путем реакции с каталитически важной карбоксильной группой (Asp215 у пепсина) [1341-1343, 2685-2688]. Наиболее известным из них является метиловый эфир диазоацетилнорлейцина:

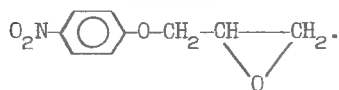


Соединения этого типа реагируют с протеазами в присутствии ионов Cu^{2+} . Механизм реакции, по-видимому, заключается в образовании сначала комплекса карбена с ионом меди [1343, 2689]:



Поскольку карбеновый комплекс несет положительный заряд, вероятно, он связывается с ионизированной карбоксильной группой. Исследование pH-зависимости инактивации [1342, 1343] указывает на участие протонированной группы с $\text{pK}_a \approx 5$. Таким образом, реакция идет, по-видимому, с протонированной COOH -группой остатка Asp215 при участии соседней ионизированной карбоксильной группы. Ни денатурированный пепсин, ни пепсиногены не реагируют с диазосоединениями [1341, 2685]. Диазосоединения были использованы для введения ЭПР-метки в активный центр аспартатных протеаз [2690].

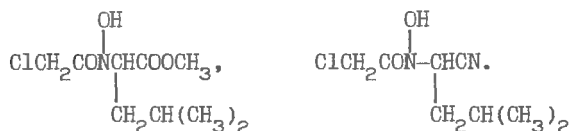
Другими группоспецифическими реагентами для аспартатных протеаз являются эпоксиды типа 1,2-эпокси-3-(*n*-нитрофенокси)-пропана [2691]:



В кислой среде эпоксиды реагируют с карбоксилатными группами [2692]. Было показано [2693], что этот реагент образует сложноэфирную связь с остатком Asp32 в пепсине. Кроме того, в определенных условиях затрагивается группа Asp215 и остаток Met180.

Рентгеноструктурные исследования пенициллопепсина, ингибированного эпоксисоединениями, показали [1345], что карбоксилат-ион Asp32 атакует атом C-1 эпоксида, тогда как реакция с Asp215 идет по атому C-2.

Металлсодержащие амидгидролазы. Для этой группы ферментов наиболее специфическими реагентами являются хелатирующие вещества (этилендиаминтетрауксусная кислота, 1,10-фенантролин), связывающие ион металла (см. разд. 5.9.2). Кроме того, весьма специфически реагируют обратимые ингибиторы, описанные в разд. 5.9.3. Группоспецифические необратимые ингибиторы для этих ферментов в настоящее время отсутствуют. Имеются лишь сообщения о действии некоторых ингибиторов на отдельных представителей металлсодержащих амидгидролаз. Так, описано [2694] действие хлорацетилгидроксамата метилового эфира лейцина и соответствующего нитрила на термолизин:



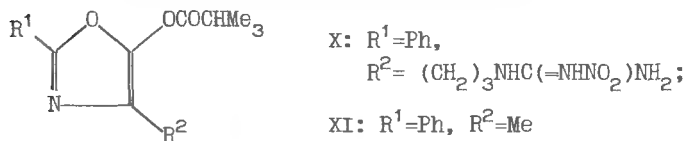
Действие этих соединений основано, по-видимому, на образовании хелата с ионами Zn^{2+} и на этерификации остатка Glu143 в термолизине [2695].

Галокетонаты – производные незащищенного лейцина – действуют на лейцин-аминопептидазу как обратимые ингибиторы [2696].

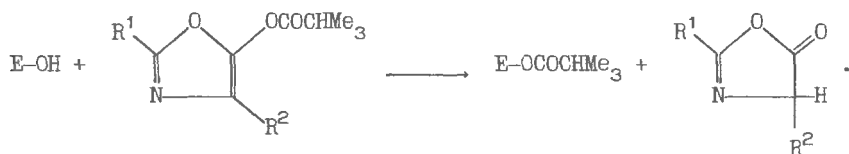
5.9.5. "Синкаталитические" ингибиторы

Некоторые субстраты и субстратоподобные соединения реагируют с амидгидролазами так, что подвергаются гидролитическому расщеплению и одновременно инактивируют фермент. Такие соединения можно назвать "синкаталитическими" ингибиторами. Их также называют "субстратами-самоубийцами" ("suicide-substrates").

Примером таких соединений являются 5-ацилоксиоксазолы [2697]:

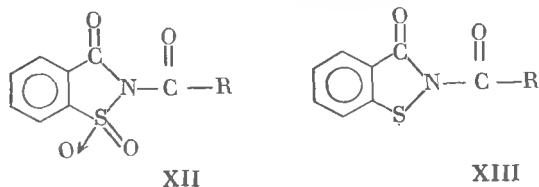


При взаимодействии с тромбином, химотрипсином или трипсином (но не плазмином) эти соединения ацилируют каталитически активный остаток серина с образованием устойчивого пивалоил-фермента:



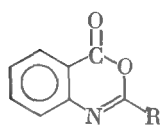
Ацилирование тромбина соединением XI идет с константой скорости $k_t/K_t = 2,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$.

Другой, но близкий тип соединений, ингибирующих эластазу, химотрипсин, трипсин и катепсин G, – это соединения (XII) и (XIII) [2698]:

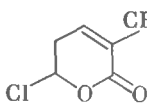


Действие их также основано на реакции ацилирования фермента. Аналогичный механизм инактивации постулирован в отношении бензоксазионов (XIV) [2699],

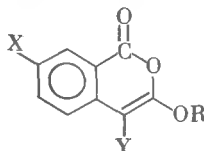
замещенных пиранов (XV) [2700], изокумаринов (XVI) [2701] и эноллактонов (XVII) [2702]. Скорость деацилирования трипсина, ацилированного соединением (XVI) ($X=Y=H$, $R=(CH_2)_3NH_3^+$), составляет всего лишь $5,3 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Рентгено-структурный анализ комплекса соединения (XV) с химотрипсином показывает [2700], что ингибитор образует солевую связь с имидазолом His57 и, по-видимому, препятствует подходу молекулы воды на стадии деацилирования.



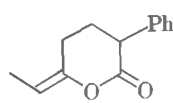
XIV



XV

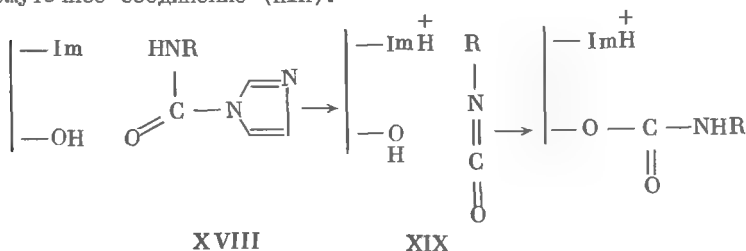


XVI



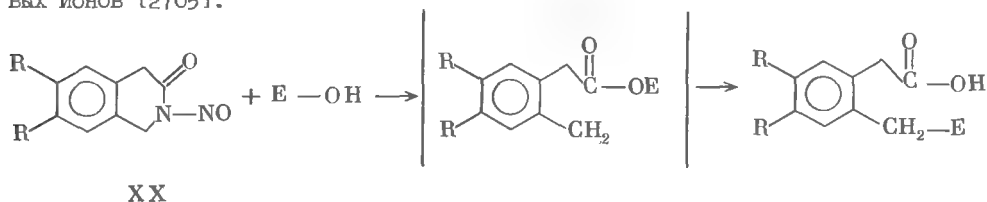
XVII

Эластаза эффективно реагирует с карбаматами типа XVIII [2703] через промежуточное соединение (XIX):



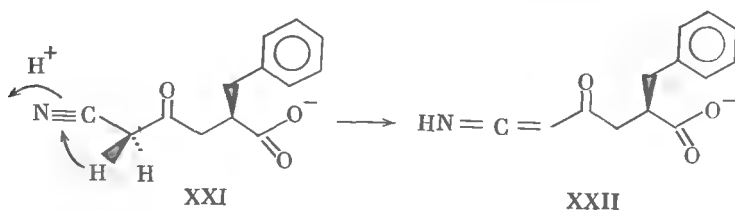
Инактивация некоторыми "синкаталитическими" ингибиторами, например, галлоиденоллактонами [2704], связана с образованием ковалентной связи с каким-нибудь нуклеофилом фермента, происходящим на стадии промежуточного ацилфермента.

Еще один тип ингибиторов основан на промежуточном образовании карбониевых ионов [2705]:



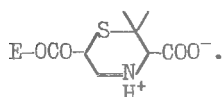
Соединение XX ($R=OMe$) ингибирует химотрипсин на 98% за 5 мин.

Нитрилы типа (XXI) инактивируют карбоксипептидазу А через стадию промежуточного образования кетимина (XXII) [2706]:



К "синкаталитическим" ингибиторам принадлежат и многие антибиотики пенициллиновой группы, инактивирующие D-аланинкарбоксипептидазы и β-лактамазы за счет ацилирования каталитически активного остатка серина β-лактамной карбонильной группой [256,263,2707].

Показано [2708], кроме того, что 6-β-бромпенициллановая кислота инактивирует β-лактамазу I, образуя ацильное производное фермента

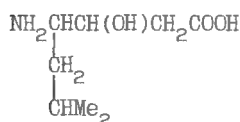


Наконец, возможно, что к "синкаталитическим" ингибиторам амидазы из *Pseudomonas aeruginosa* относится мочевины, оксимочевина и цианат, необратимо инактивирующие этот фермент за счет реакции по активному центру [2103].

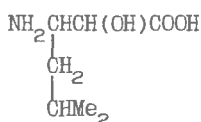
5.9.6. Природные ингибиторы

Существуют два типа природных ингибиторов амидгидролаз: низкомолекулярные, микробные ингибиторы (см. обзоры: [2709,2710]) и белковые ингибиторы животного или растительного происхождения [2711-2714].

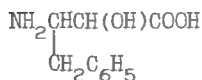
Микробные ингибиторы продуцируются различными штаммами *Aspergillus*. Эти соединения очень эффективно и специфично ингибируют протеазы различных классов так, что они могут быть отнесены к ряду группоспецифических ингибиторов. Эти соединения содержат весьма необычные производные аминокислот:



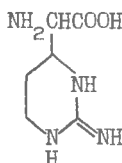
статины [S,S] (Sta)



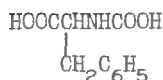
десметиленстатины [R,S] (Dst)



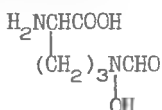
4-фенил-3-амино-2-оксимасляная кислота [R,S] (Pab)



α-[2-иминогексагидро-4-пиримидил]-глицин [S,S] (Pgl)



N-карбокси-фенилаланин [S] (Cph)



5-(формилоксиамино)-2-амино-валериановая кислота (Oav)

В табл.63 приведена эффективность таких ингибиторов в отношении амидгидролаз различных групп [2709,2710,2715-2722].

Таблица 63. Микробные ингибиторы амидгидролаз

Название	Структура*	Ингибируемый фермент	K_i , нМ или (I_{50} мкг/мл)
Лейпептин	RCOLeuLeuArgH	Трипсин Плазмин Катепсин В Акрозин Папаин	130 (100) (0,44) 70 (0,08)
Антипаин	NCph-ArgLeuArgH	Трипсин Катепсин А Катепсин В Плазмин Папаин	(0,26) (1,2) (0,6) (93) (0,16)
Химостатин	NCph-Pgl-XaaPheH Xaa=Leu(A), Ile(B), Val(C)	Химотрипсин Катепсин А Катепсин В Катепсин D Папаин	(0,15) (62,5) (2,6) (49) (7,5)
Эластатиналь	NCle-Pgl-GlnAlaH	Эластаза	240
Пепстатин	RCOValStaAlaStaOH (R=i-Pr, Ac, Lac)	Пепсин Катепсин D Ренин Гастриксин Протеаза ВИЧ-1	1 10 0,13 100 20
Е-64	Eps-LeuAbg	Катепсин D	(240)
Е-64с	Eps-LeuDmpa	Катепсин L	(110)
Лохистатин	EtO-Eps-LeuDmpa	Папаин	-
Бестатин	Pab-LeuOH	Аминопептидаза В	(160)
Фосфоамидон	6-dMan-PLeuTrpOH	Лейцинамино-пептидаза	(32)
Амастатин	Dst-ValValAspOH	Термолизин Аминопептидаза А	28 (0,54)
Арфаменин	HArg-CH ₂ CH(CH ₂ C ₆ H ₄ OH)COOH [S,R]	Лейцинамино-пептидаза Аминопептидаза В	(0,5) (0,002)
Фороксимитин	Oav-Ser-dkOav	Карбоксипептидаза А Дипептидил-карбоксипептидаза	(5,2) (7,0)

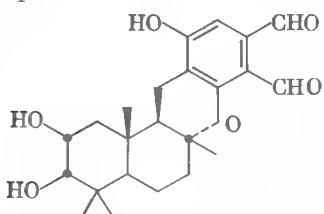
*Сокращения см. выше, а также: ArgH - аргиналь; NCph - в образовании амидной связи участвует HNCOOH группа; PheH - фенилаланиналь; NCle - N-карбокси-[S]-лейцин; AlaH - аланиналь; Eps - эпоксиянтарная кислота; Abg - 4-гуанидино-1-аминобутан; Dmpa - 3,3-диметил-1-аминопропан; 6-dMan - 6-дезоксиманнопиранозил-1-фосфат; dkOav - дикетопиперазин Oav.

Для ряда микробных ингибиторов амидгидролаз проведены интересные структурно-функциональные исследования. Так, было изучено действие различных аналогов и производных пепстатина [2723-2727]. Оказалось, что этерификация

C-концевой группы не влияет на его ингибиторные свойства. Однако ацетилирование или удаление β -оксигруппы в остатке аминокислоты статина снижает активность примерно в 1000 раз [2724]. Некоторые фрагменты пепстатина – все еще весьма сильные ингибиторы ($K_i \approx 3 \cdot 10^{-6}$ М) [2725]. Предполагается, что ингибиторная активность пепстатина обусловлена сходством его структуры со структурой переходного состояния в реакциях, катализируемых аспартатными протеазами (об аналогах переходных состояний см. разд. 5.9.7) [2725]. Сходные представления существуют в отношении фосфоамидона [2728]. Пепстатины, отличающиеся ацильной группой (R=изо-валерил, ацетил, лактил), по-разному ингибируют аспартатные протеиназы [2729]. Так, протеаза вируса ВИЧ-1 слабо подавляется изовалерилпепстатином ($K_i \approx 1 \cdot 10^{-4}$ М) [2730], тогда как ацетилпепстатин весьма эффективен ($K_i \approx 20$ нМ при pH 4,7) [2731]. [2731].

Различные производные эпоксидного ингибитора цистеиновых протеаз E-64 были исследованы [2720, 2732–2735] в отношении скорости ингибирования папаина и катепсинов В и Н. Последний реагирует с E-64 существенно медленнее, чем первые два фермента. Исследование различных стереоизомеров и аналогов бестатина [2717, 2736, 2737] показало важность конфигурации атома C-3 в остатке 3-амино-2-окси-4-фенилмасляной кислоты. Конфигурация остальных асимметрических атомов бестатина мало сказывается на активности.

Из культуры *Stachybotrys complementi* был выделен интересный ингибитор (K-67) [2738, 2739], подавляющий систему комплемента на стадии активации C5-фактора:



K - 76

Следует отметить случаи нечувствительности некоторых протеаз к группоспецифическим микробным ингибиторам. Так, протеазы *Scytalidium lignicolum* и протеиназа А из *Aspergillus niger*, по всем своим свойствам являющиеся аспартатными амидгидролазами, нечувствительны к пепстатину [909, 2740]. Кроме того, отмечен случай инверсии свойств лейпептина в отношении подавления активности катепсина В при переходе от опытов *in vitro* к опытам на животных. В последнем случае лейпептин оказался эффективным стимулятором катепсина В [2741].

Белковые ингибиторы. Биологические жидкости и ткани животных и растений содержат большое число ингибиторов протеаз. Это белки или гликопротеины с молекулярной массой от 3000 до 700 000. Однако большая часть хорошо изученных в настоящее время белковых ингибиторов содержит 60–70 аминокислотных остатков. Число известных сейчас ингибиторов очень велико. Сведения о многих из них можно найти в обзорах [2711–2714, 2742–2758].

Наряду с ингибиторами широкого спектра действия, такими, как α_2 -макроглобулин [2759], большая часть ингибиторов проявляет определенную групповую специфичность.

Особенно распространены ингибиторы сериновых протеиназ. Их предложено

классифицировать, как минимум, на 10 семейств [2749]. Сюда входят ингибиторы семейства панкреатического трипсинового ингибитора Куница [2711,2712], семейства панкреатического секреторного ингибитора (Казалья) [2745], субтилизинового ингибитора из актиномицетов [2760] и др.

Наиболее богатым источником белковых ингибиторов сериновых протеаз является плазма крови. Содержание ингибиторов в плазме доходит до 10% от общего содержания белков [2758]. Наибольшую концентрацию в плазме имеет α_1 -анти-трипсин (или α_1 -ингибитор протеиназ) [2761]. Этот белок (M_r 52 кДа) ингибирует ряд сериновых протеиназ, но подавляет, главным образом, активность лейкоцитарной эластазы [2762]. Известна его полная аминокислотная последовательность [2763] и пространственная структура [2764,2765]. В плазме содержатся также антитромбин III [2743], α_1 -антихимотрипсин [2751,2766], α_2 -антиплазмин [2767,2768], ингибитор белка C [2769], ингибитор C1-фактора комплемента [2742,2770] и ряд других ингибиторов системы комплемента [2771, 2772].

Вся эта группа ингибиторов среднего размера получила название "серпины" (от *Serine Proteinase Inhibitors*) [2758]. К "серпинам" относят и некоторые ингибиторы из других источников, например насекомых [2773].

Ингибиторы из поджелудочной железы человека и животных – это, главным образом, основной панкреатический ингибитор трипсина Куница и секреторный панкреатический ингибитор трипсина Казалья, которые упоминались выше. Они представляют собой небольшие белки (58 и 56 аминокислотных остатков соответственно), подавляющие активность не только трипсина, но и ряда других сериновых протеиназ. Первый из них, исследован весьма подробно в структурном отношении (см. гл.6). Первичная структура второго была выяснена сравнительно недавно [2774]. Ингибитор типа Куница содержится не только в поджелудочной железе, но обнаружен также в селезенке [2775] и плазме [2776]. Эффективные ингибиторы сериновых протеаз обнаружены в семенной жидкости [2744,2777] и молозиве коровы [2746].

Ингибиторы сериновых протеаз весьма широкого спектра действия – овомукоиды из яиц кур, индейки, а также улитки [2714,2778–2780]. Овомукоид японской улитки – трехдоменный белок (186 остатков), один из доменов которого (III домен – 56 остатков), будучи выделен, подавляет активность сериновых протеиназ животных и микроорганизмов. Известна его пространственная структура [2778].

Богатым источником ингибиторов сериновых протеиназ является секрет медицинской пиявки. Весьма эффективным в отношении тромбина является гирудин – белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков [2747,2781–2784]. Другой ингибитор – эглин [2755] специфичен, в основном, в отношении эластаз и катепсина G. Еще в одном виде пиявок (*Haementaria officinalis*) обнаружен [2785, 2786] эффективный ингибитор фактора Ха – антистазин. Это белок из 119 аминокислотных остатков, содержащий 20 остатков полуцистина.

Яд змей (*Russel viper*, *Vipera ammodytes* и др.) содержит большой набор ингибиторов трипсина, химотрипсина, калликреина и плазмина [2664,2787].

Близкими к серпинам являются нексины, продуцируемые фибробластами и глиальными клетками и подавляющие активность тромбина и урокиназы [2788].

Наконец, разнообразные ингибиторы сериновых протеиназ содержатся в семенах растений – соевых и лимских бобах [2789], зернах ячменя [2790], семенах

тыквы [2791] и др., а также у микроорганизмов, например ингибитор субтилизина из *Streptomyces* [2792] и ингибитор активатора плазминогена из *Escherichia coli* [2793].

Активность цистеиновых протеаз подвержена регулированию большим числом специфических ингибиторов [2714]. Важное значение имеют ингибиторы тканей и биологических жидкостей млекопитающих. Их делят на два больших класса – низкомолекулярные, включающие две группы – цистатины и стефины, и высокомолекулярные, главным образом, кининогены [2794].

Цистатины – белки, содержащие около 115 остатков аминокислот и две дисульфидные связи вблизи С-конца молекулы. К этой группе относятся наиболее изученные цистатины 1 и 2 из белка куриных яиц [2795–2797] и ряд аналогичных белков из тканей и плазмы человека и крыс, молосива, яда змей и др. [2798–2803]. Яичные цистатины 1 и 2 отличаются наличием фосфорного остатка, связанного с Ser80 в цистатине 2 [2804]. Стефины – белки, содержащие около 100 аминокислотных остатков и, как правило, не содержащие S-S мостиков [2805–2808].

Наконец, было обнаружено, что как низко-, так и высокомолекулярные формы кининогенов являются эффективными ингибиторами цистеиновых протеаз и содержат 2–3 участка, сходных по структуре с цистатинами [2794, 2809–2811]. Эволюционные взаимоотношения трех групп ингибиторов представлены на рис. 86 [2794, 2812].

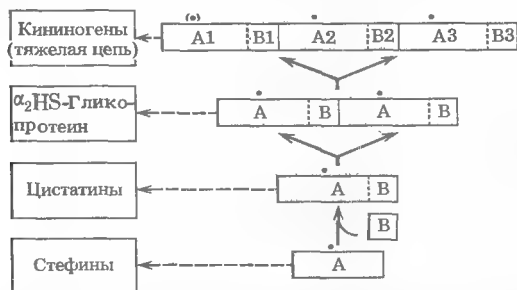


Рис.86. Эволюционные взаимоотношения ингибиторов цистеиновых протеаз животных. А – N-концевой фрагмент "внутреннего длинного повтора" тяжелой цепи кининогенов человека, В – соответствующий С-концевой фрагмент. Звездочками отмечены места потенциальных активных центров [2794, 2812]

Все эти ингибиторы подавляют активность папаина, фицина, катепсинов В, L и Н, дипептидилпептидазы I в пикомолярных концентрациях [2714, 2813, 2814], но не действуют на калпаины. Последние подавляются специфическим ингибитором, состоящим из 718 остатков аминокислот и содержащим 4 домена, каждый из которых взаимодействует с калпаинами [2815, 2816].

Ингибиторы цистеиновых протеиназ широко распространены в растениях [2817–2819].

Значительно меньше сведений имеется в отношении белковых ингибиторов аспартатных и металлсодержащих протеаз. Пепсин и карбоксипептидазы подавляются ингибитором из гельминтов (*Ascaris*) [2820, 2821]. Известен ренинсвязывающий белок (M_r 56 кДа) – эндогенный ингибитор почечного ренина [2822].

Ингибиторы катепсина D, карбоксипептидазы А и термолизина обнаружены в картофеле [2823, 2824] и томатах [2825]. Это небольшие белки в 38–39 остатков аминокислот. Ингибитор термолизина из *Streptomyces* содержит 102 остатка [2826]. Белок с M_r 36 кДа, подавляющий активность коллагеназы, выделен из костной ткани кроликов [2827]. Этот белок близок по структуре к тканевому ингибитору металлопротеиназ [2828].

Несколько особняком стоит ингибитор широкого спектра действия, содержащийся в-плазме крови - α_2 -макроглобулин [2750,2757,2759]. Этот тетрамерный белок с M_r 725 кДа состоит из двух, связанных нековалентно димеров, каждый из которых содержит две цепи, связанные дисульфидной связью. Он ингибирует практически все типы протеаз [2750,2759,2829].

Большинство белковых ингибиторов содержат в своей последовательности консервативные участки, являющиеся их активными центрами (табл. 64).

Таблица 64. Последовательность аминокислот в области активных центров некоторых белковых ингибиторов [2745,2758,2812,2815,2830]

Ингибитор	Последовательность в области активного центра
α_1 -Антитрипсин	ProMet-Ser [▼] IleProPro*
α_2 -Антиплазмин	Ser-ArgMetSerLeu
Антитромбин III	GlyArg-SerLeuAsnPro
α_1 -Антихимотрипсин	LeuLeu-SerAlaLeuVal
O1-Ингибитор	AlaArg-ThrValLeuVal
Панкреатический ингибитор Куница	CysLys-AlaArgIle
Секреторный ингибитор Казала	TyrLys-IleTyr
3-й домен овомукоида индейки	ProArg-AspTyr
Ингибитор яда гадюки Русселя	CysArg-GlyHis
Ингибитор трипсина соевых бобов	ThrLys-SerAsnProPro
Цистатины	GlnVal-ValAlaGly
Ингибитор калпаинов	ThrIle-ProPro-X-TyrArg

*Стрелкой указана расщепляемая или потенциально расщепляемая амидная связь.

Среди ингибиторов сериновых протеаз имеются такие, которые действуют только, или преимущественно, на ферменты трипсиновой группы, и те, которые специфичны к химотрипсиноподобным протеазам. Однако довольно распространены и так называемые поливалентные, или "двухголовные", ингибиторы, подавляющие активность как трипсина, так и химотрипсина.

Решающее значение для активности белковых ингибиторов имеет относительно небольшой участок последовательности, включающий остатки основных аминокислот (Arg, Lys) для ингибиторов трипсиновых ферментов или остатки алифатических аминокислот (Leu и др.) для химотрипсинингибирующих белков. В поливалентных ингибиторах обе последовательности входят в состав одной молекулы. Наблюдается значительная гомология в последовательности около активных центров ингибиторов из различных источников, но остатки Lys и Arg могут варьировать даже для одного ингибитора, полученного из разных видов животных. Был получен ряд полусинтетических панкреатических трипсиновых ингибиторов (BPTI) с заменой остатка лизина-15 на Gly, Ala, Val и т.д. [2831]. Такая замена увеличивает сродство ингибитора к эластазе.

Предложен [2749] стандартный кинетический механизм ингибирования, который справедлив для большинства ингибиторов сериновых протеиназ и ряда дру-

гих белковых ингибиторов. Он заключается в образовании сначала нековалентного комплекса EI, изомеризующегося в прочный комплекс (C), в котором может происходить расщепление определенной связи в ингибиторе с образованием "ацил-фермента". Последний затем деацилируется и образует "модифицированный" ингибитор (I*), который очень медленно диссоциирует из комплекса:

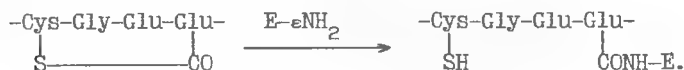


Однако многие ингибиторы не подчиняются такому стандартному механизму [2757]. Так, панкреатический трипсиновый ингибитор образует с трипсином стабильное соединение с заметно искаженной (пирамидализованной) амидной связью Lys15-Ala16 (см. гл.6), а не ковалентную связь с остатком серина активного центра. Это подтверждается способностью модифицированных по активному центру ферментов (ангидротрипсин, N^ε-метилглутимидин-57-химотрипсин) эффективно связывать ингибитор [2081,2832].

В четырех цистатинах, кроме указанного в табл.64 консервативного участка, важную роль играет сегмент Gly9-Ala10, который, возможно, расщепляется ферментом [2796], хотя по данным рентгеноструктурного анализа эта связь расположена далеко от тиоловой группы активного центра [2797].

С другой стороны, направленный мутагенез остатков аминокислот в области GlnValValAlaGly не влияет на связывание цистатина А с цистеиновыми протеиназами [2833].

Ковалентную связь с ферментом образуют и такие ингибиторы, как α₂-макроглобулин [2834]. Для объяснения ингибиторных свойств этого белка была предложена [2835] гипотеза "захвата". Она заключается в том, что связывание ингибитора с ферментом сопровождается расщеплением ингибитора и существенными конформационными перестройками, приводящими к появлению свободных SH-групп, маскированных в нативном α₂-макроглобулине в виде тиозфира с остатками Glu. Карбоксильные группы Glu образуют затем ковалентную связь с ингибируемым ферментом [2759, 2836-2839]:



При связывании ингибитора карбоксипептидазы А из картофеля с ферментом происходит отщепление С-концевой аминокислоты ингибитора [2840], однако полученный укороченный ингибитор по-прежнему сохраняет способность связываться с ферментом. Модификация остатка активного центра Glu270 в карбоксипептидазе А предотвращает связывание ингибитора из *Ascaris* [2841,2842].

5.9.7. Ингибиторы – "аналоги переходных состояний"

Еще в 1946 г. Полинг [2843] обратил внимание на то обстоятельство, что субстрат в переходном состоянии ферментативной реакции должен связываться ферментом значительно эффективнее, чем в основном состоянии. Только в 1970-х годах эта идея была развита [2844,2845] и были предприняты попытки создать стабильные ингибиторы, имитирующие переходное состояние (см. обзор: [2846]).

Таблица 65. Ингибирование амидгидролаз некоторыми аналогами переходных состояний

Фермент	№	Ингибитор	K_i , нМ	Литературный источник
α -Химотрипсин	1	AcLeuPheCH ₃	$2,5 \cdot 10^4$	[2859]
	2	CH ₃ (CH ₂) ₅ B(OH) ₂	$2,7 \cdot 10^6$	[2847]
	3	C ₆ H ₅ (CH ₂)B(OH) ₂	$9 \cdot 10^4$	[2848]
	4	C ₆ H ₅ CONHCH ₂ B(OH) ₂	$5 \cdot 10^3$	[2849]
	5	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(NHCOCH ₃)B(OH) ₂	$2 \cdot 10^3$	[2850]
	6	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ CHO	$3 \cdot 10^5$	[2860]
	7	MeOSuc(Ala) ₂ ProNHCH(R)B(OH) ₂		
Эластаза лейкоцитарная	8	Соедин.7, R=CH ₂ C ₆ H ₅	0,16	[2852]
	9	То же, R=CHMe ₂	0,57	[2852]
Химаза	10	Соедин.8	58	[2853]
α -Литическая протеаза	-	То же	68	[2861]
Мезентерико-пептидаза	11	CH ₃ (CH ₂) ₇ B(OH) ₂	$1,58 \cdot 10^6$	[2862]
	12	C ₆ H ₅ B(OH) ₂	$0,63 \cdot 10^6$	[2862]
Субтилизин BPN'	-	Соедин.11	$1,5 \cdot 10^6$	[2863]
	" 12	" 12	$6,2 \cdot 10^6$	[2864]
Пенициллинамидаза	13	CH ₃ (CH ₂) ₄ B(OH) ₂	830	[2865]
Трипсин	-	Соедин.1	$89 \cdot 10^6$	[2866]
	14	NH ₂ (NH-)CNHC ₆ H ₄ CH ₂ COOH	650	[2867]
Эластаза панкреатическая		Соедин.8	0,25	[2852]
Аспарагиназа <i>Escherichia coli</i>	15	HOOCCH ₂ CH(NH ₂)CHO	3,6	[2868]
Папаин	16	C ₆ H ₅ CONHCH ₂ CHO	$2 \cdot 10^3$	[2869]
	17	AcPheNHCH ₂ CHO	5,2	[2869]
	18	ZLeuNleH*	138	[2870]
Калпаин I	-	Соедин.18	52	[2870]
Карбоксипептидаза A	19	HOCH ₂ CH(CH ₂ Ph)COOH	480	[2871]
Лейцинаминопептидаза	20	NH ₂ CH(CH ₂ Ph)BO ₂ R'*	60	[2872]
Ренин	21	BooPheValPheCF ₂ CH ₂ NH-t-Bu*	3,5	[2873]

* [I]₅₀.

**R' - пинаконовый эфир.

Первые такие ингибиторы амидгидролаз - алкилборные кислоты были получены и исследованы в 1968 г. [2847]. В последующие годы были получены многочисленные производные борных кислот, в том числе пептидилборные кислоты [2848-

2853]. Эти соединения ингибируют не только сериновые протеазы, но и лактамазы [2854,2855], аминокептидазы [2856] и некоторые эстеразы [2857,2858].

В то время, как производные борных кислот – аналоги неспецифических субстратов сериновых протеаз – довольно слабые ингибиторы (табл.65), пептидил-борные кислоты ингибируют в наномолярных концентрациях.

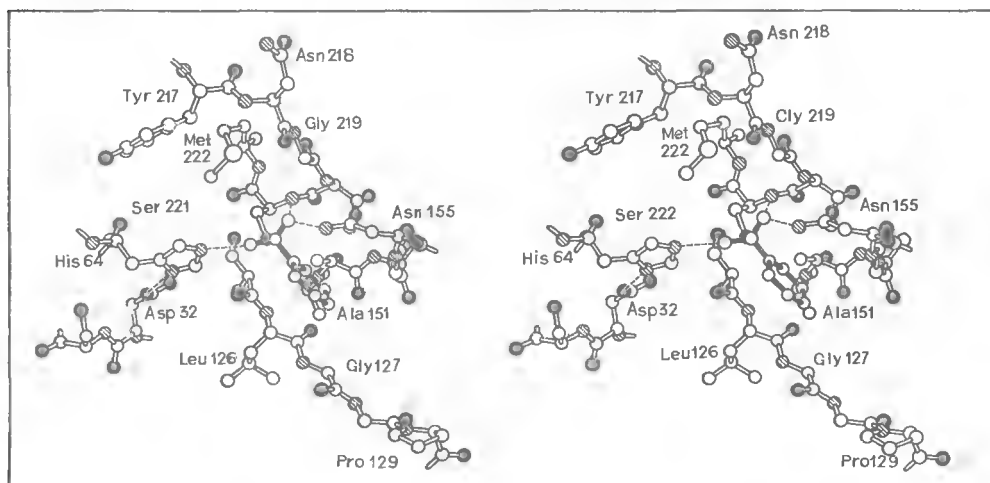
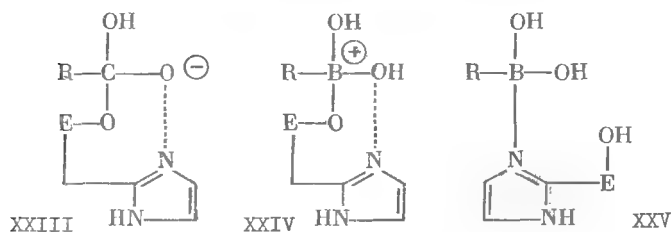


Рис.87. Стереопара участка активного центра субтилизина BPN' в комплексе с фенилборной кислотой (выделена сплошной линией) [2875]

Алкилборные кислоты, как это подтверждается данными рентгеноструктурных исследований [2874-2877] и исследованием ^{11}B -ЯМР спектров [2878] образуют с сериновыми протеазами комплекс, сходный по строению с тетраэдрическим промежуточным соединением (рис.87).

Таким образом, комплексы этих ингибиторов (XXIV) действительно напоминают по структуре переходное состояние, или тетраэдрическое промежуточное соединение (XXIII):

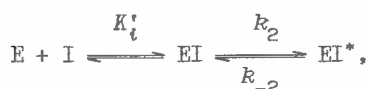


Однако, по данным ^{15}N -ЯМР, фенилборная кислота образует ковалентную связь не с серином, а с гистидином активного центра α -литической протеазы (XXV) [2879]. По-видимому, такое строение характерно для комплексов с аналогами неспецифических субстратов.

Связывание алкилборных кислот с ферментами сопровождается конформационными перестройками, что обнаруживается по спектральным изменениям в белке [2880].

Было показано, что комплексообразование алкилборных кислот с некоторыми ферментами происходит ступенчато – сначала, вероятно, возникает координаци-

онная связь с имидазолом активного центра (EI), а затем происходит взаимодействие с остатком серина (EI*) [2861,2864,2880]:



причем наблюдаемая константа ингибирования $K_t = K'_t(1 + k_2/k_{-2})$.

Для реакции фенилборной кислоты с субтилизином BPN' были определены значения $K'_t = 0,6$ мМ и $k_2/k_{-2} = 9,25$ [2864], а связывание соединения 8 (табл.65) с α -литической протеазой характеризуется значениями $K'_t = 6,4$ нМ и $k_2/k_{-2} = 9,6$ [2861].

В качестве "аналогов переходных состояний" для амидгидролаз рассматриваются также аминоксил- и пептидилальдегиды [2860,2870,2881-2883], в том числе природные альдегиды – лейпептин, антипаин, химостатин, эластатиналь (см. разд.5.9.6). Ингибирующая способность альдегидов обусловлена образованием полуацеталей или тиоацеталей с каталитически активными группами сериновых или цистеиновых протеаз [2872,2884,2885] и сопровождается конформационными перестройками в белке [2886].

В разд.5.9.3 уже упоминались в качестве ингибиторов пептидифторметилкетоны общей формулы:



где RCO – ациламинокислота или пептид, а X – H, F или пептид. Рентгеноструктурные [2887] и ЯМР-данные [2888,2889] показывают, что эти соединения образуют с сериновыми и цистеиновыми амидгидролазами соответственно гемикетали или гемитиокетали. Аналогично ведут себя пептиды – аналоги субстратов, у которых вместо расщепляемой пептидной группы содержится кетогруппа – COCH₂ (см., например: [2890]). Одним из признаков сходства ингибиторов с переходным состоянием субстрата является линейная корреляция $\lg K_t$ с $\lg K_m/k_{cat}$ (а не $\lg K_m$) [2891].

В качестве аналогов переходного состояния рассматриваются также природные ингибиторы амидгидролаз – фосфоамидон и пепстатин (см. разд. 5.9.6) [2891]. Рентгеноструктурные данные [2892,2893] показывают, что фосфорная группа своим атомом кислорода образует координационную связь с атомом цинка в термолизине, однако более близким к переходному состоянию является комплекс термолизина с $(HO)_2P(O)NHLeuNH_2$. В этом случае оба кислородных атома ингибитора связаны с Zn, т.е. последний становится пентакоординированным [2893].

В комплексе пепсина с пепстатином роль тетраэдрического атома углерода играет β -углерод остатка статина [2725] (подробнее см. гл.6.). Комплексообразование пепстатина с пепсином происходит ступенчато [2894].

Являются ли ингибиторы – "аналоги переходных состояний" – действительно аналогами переходного состояния субстрата в реакциях гидролиза? По моему мнению, этот термин весьма сомнителен.

Связывание борной кислоты, например с химотрипсином, и связывание ее с модельным соединением – амидом салициловой кислоты примерно одинаково

($\Delta G_0 = -1,4$ и $-2,1$ ккал/моль соответственно [2848]), так что борная кислота даже эффективнее связывается в модельном опыте. В то же время свободная энергия переноса фенилэтильной группы из воды в октанол ($-4,2$ ккал/моль [1971]) равна свободной энергии переноса этой группы из воды в полость активного центра фермента. Таким образом, суммарное изменение свободной энергии при связывании фенилэтилборной кислоты ферментом ($-5,6$ ккал/моль) не выше, а даже ниже, чем свободная энергия связывания этого соединения с модельным веществом и энергия переноса в неполярное окружение ($-6,3$ ккал на моль). Повышенное сродство этих "аналогов переходного состояния" определяется просто дополнительными по сравнению, например, с эфиром гидрокоричной кислоты ($\Delta G_0 = 3,7$ ккал/моль [2468]) взаимодействиями в активном центре фермента. То же самое можно сказать об альдегидах, образующих ковалентную связь с каталитически активной группой фермента. Что касается пепстатина, то связывание его с пепсином ($\Delta G_0 = -12,4$ ккал/моль) ухудшается при удалении гидроксильных групп (имитирующих, как предполагается [2725, 2895], структуру переходного состояния), но приводит к снижению свободной энергии всего на $3,2$ ккал/моль [2724]. Это вполне может быть отнесено к образованию гидроксильных слабых (или слабой) водородных связей с ферментом. В лучшем случае этот тип ингибиторов можно было бы назвать аналогами промежуточного тетраэдрического соединения.

Алкилборные кислоты оказались полезным инструментом для анализа топографии активных центров сериновых протеаз [2847, 2862, 2863]. Исследование зависимости K_i от длины углеводородной цепи позволяет составить представление о расстояниях между каталитическим и сорбционным центрами и о протяженности последнего (рис. 88).

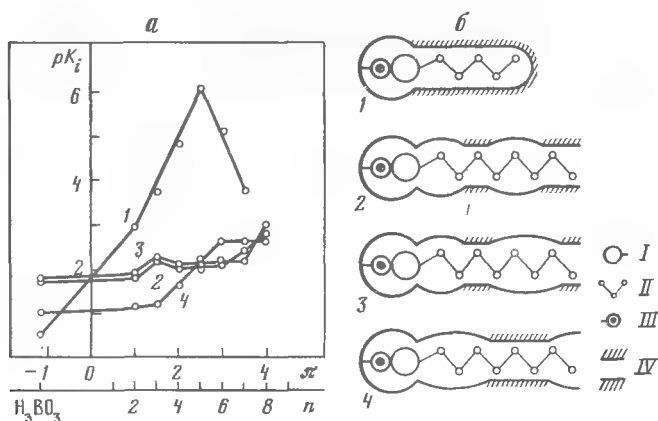


Рис. 88. Зависимость констант ассоциации алкилборных кислот от длины алкильной цепи (и гидрофобности) (а) и схематическое представление топографии активных центров амидгидролаз (б)

1- пенициллинамидаза; 2- мезентерикопептидаза; 3- субтилизин;
4- химотрипсин; I- $B(OH)_2$; II- алкильная цепь; III- каталитические группы фермента; IV- гидрофобный участок

5.10. Активация

Ряд органических соединений активрует ферментативный гидролиз. К числу таких активаторов относятся субстратоподобные соединения и соединения, имитирующие отдельные фрагменты субстрата. Для некоторых ферментов отмечается способность активироваться избытком субстрата (см. разд.5.9.3). Кроме того, хорошо известна активирующая роль ионов металлов. В этом отношении интересным примером является плазменный белок С, активность которого линейно зависит от квадрата концентрации ионов Na^+ [2896,2897].

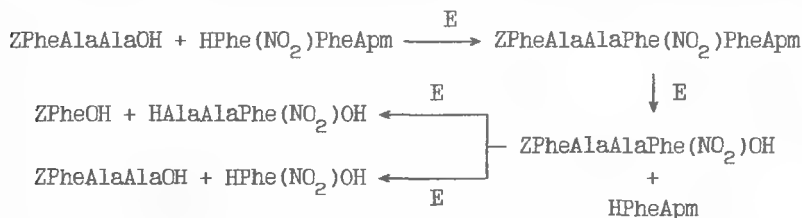
Кинетическая активация описывается тем же обобщенным уравнением (25) (см. разд.5.9.1), что и действие ингибиторов при значениях $\beta > 1$ и $\alpha \leq 1$. При $\alpha > 1$ в зависимости от соотношения α и β будет наблюдаться ингибирование или активация.

Типичным примером активации субстратом является катализ карбоксипептидазой А, где комплекс ES_2 превращается в продукты реакции в 2-5 раз быстрее, чем комплекс ES [1738]. Активация субстратом была также отмечена при катализе эластазой из лейкоцитов [2898] и некоторыми другими ферментами.

Катализ карбоксипептидазой А ускоряется также при введении ряда пептидов, не гидролизующихся этим ферментом [2899]. Такие пептиды обладают большим сродством к ферменту, чем субстраты, а комплекс EA (где А - активатор) лучше связывает субстрат, чем свободный фермент.

Сходным образом ведут себя аспартатные протеазы - пепсин и пенициллопепсин [2900-2904]. В случае пенициллопепсина гидролиз LeuTyrNH_2 ускоряется негидролизуемым пептидом LeuGlyLeu , причем увеличивается k_{cat} ($\beta \approx 10$), а K'_m остается неизменной. Сродство фермента к активатору $K_A = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ [2900].

Детальное исследование активации пепсина [2901-2904] показало, что в зависимости от структуры субстрата и активатора активация может проходить по неконкурентному ($\alpha=1$, $\beta > 1$) и смешанному (α и $\beta > 1$) типам. Значения β в отдельных случаях достигают 70. Обязательным условием активации оказалось наличие у субстрата и активатора, по крайней мере, по одной незащищенной концевой амино- или карбоксигруппы. Было установлено [2902], что при катализированном пепсином гидролизе дипептида $\text{HPh}(\text{NO}_2)\text{PheApm}$ в присутствии трипептида $\text{ZPh}(\text{AlaAlaOH})$ активация происходит по механизму синтеза-гидролиза:



Аналогичные данные были получены для других пептидов [2903,2904]. Возможно, синтез-гидролиз играет важную роль и в случае активации гидролиза другими ферментами.

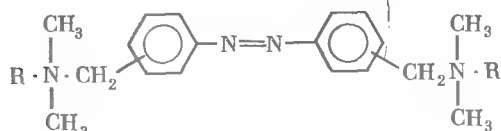
Связывание активатора аспартатными протеазами приводит к заметным конформационным перестройкам в ферменте, регистрируемым по изменению спектров кругового дихроизма [2900].

Чисто сорбционный тип активации наблюдается при трипсиновом катализе гидролиза короткоцепочечных эфиров ациламинокислот в присутствии алкиламмониевых ионов [2905-2907]. В этом случае при постоянной длине боковой цепи субстрата чем короче алкильная цепь у активатора, тем эффективнее катализ. Алкиламмониевые ионы, по-видимому, взаимодействуют с катионным центром трипсина, способствуя правильной ориентации субстрата или индуцируя конформационные изменения в ферменте, способствующие катализу.

Имеются данные [2908] о существовании белкового (молекулярная масса ≈ 20 кДа) активатора катепсина D из селезенки быка, увеличивающего активность фермента в отношении белковых субстратов на 50-300%. Этот фермент активируется также этиловым эфиром глицина [2909], фосфолипидами [2910] и АТФ [2911, 2912]. АТФ-зависимая протеаза La *Escherichia coli* активируется ДНК [2913].

5.11. Аллостерические эффекторы

Следуя буквальному смыслу слова "аллостерический" ($\alpha\lambda\lambda o\varsigma$ - другой, $\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon o\varsigma$ - пространство), к подобному типу эффекторов можно отнести некоторые из рассмотренных выше активаторов, а также неконкурентные ингибиторы ферментов. Так, в качестве аллостерических активаторов рассматривались соли триалкил-аммониевых производных азобензола [2914]:



где $R = CH_3$, $CH_2C_6H_5$

ускоряющие катализируемый химотрипсином гидролиз анилидов N-ациламинокислот. Возможно, однако, что эти соединения просто препятствуют непродуктивному связыванию, характерному для анилидов, поскольку активации не наблюдается при использовании в качестве субстратов эфиров, гидроксамидов ациламинокислот, а также белков.

Свойства аллостерического эффектора трипсина обнаружены [2915] у дансил-аргинина. Это соединение связывается с ферментом как в активном центре (K_m $6,7 \cdot 10^{-3}$ М), так и вне его (K_A $4,8 \cdot 10^{-4}$ М).

Более типичным случаем является аллостерическая активация карбоксипептидазы В в отношении неспецифических для нее субстратов типа ZGlyPheON при введении в систему β -фенилпропионовой кислоты [2916]. При высоких концентрациях NaCl уже в отсутствие эффекторов наблюдается S-образная зависимость скорости гидролиза указанных субстратов от их концентрации. Активатор в низких концентрациях увеличивает скорость гидролиза, а при высоких концентрациях снижает ее. Эти факты были интерпретированы как следствие наличия у фермента двух центров связывания гидрофобных соединений, причем состояние одного из них каталитического - зависит от связывания лигандов во втором центре.

На этом образом ведут себя такие соединения, как лизин, 6-аминогексановая кислота и др. в отношении катализируемого плазмином гидролиза эфира (2917).

Типичная для аллостерических ферментов зависимость скорости от концентрации субстрата или эффектора может наблюдаться и в случаях, если фермент подвержен медленным конформационным переходам, как, например, щелочной конформационный переход в химотрипсине (см. разд. 5.2.2) [2918], или же он способен к обратимой ассоциации [2919]. Последний случай подробно исследован на примере глутаминазы из почек свиньи [2920–2922]. В зависимости от типа буферного раствора (трис, фосфат или фосфат-борат) этот фермент существует в различных олигомерных формах с разной каталитической активностью. Фосфат-боратная форма имеет кажущуюся молекулярную массу около $1,5 \cdot 10^6$ Да и образует структуру типа двойной спирали [2922]. Этот фермент аллостерически активируется красителем – бромтимоловым синим [2920].

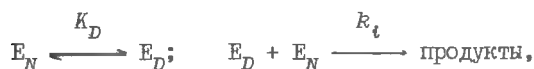
Аллостерическим эффектором дипептидилкарбоксипептидазы (ангиотензинпревращающего фермента) является ион хлора [2923, 2924]. В случае АТФ-зависимой La-протеазы АТФ также функционирует как аллостерический активатор [2925].

Истинно аллостерической протеазой является протеаза из эритроцитов овцы [435]. Этот фермент с молекулярной массой 340 кДа состоит из 6 идентичных субъединиц. Кинетика катализируемого этим ферментом гидролиза трипептида GlySerAla (но не GlyMetAla!) кооперативна с коэффициентом Хилла $n=1,8$. Близкое значение коэффициента Хилла было найдено [957] для аминопептидазы I из дрожжей. Этот фермент (600 кДа) состоит из 12 субъединиц и активируется ионами Zn^{2+} и Cl^- (или Br^-). Галоиданионы действуют таким образом, что снижают положительную кооперативность фермента по субстрату или по ионам Zn^{2+} , приближая зависимость скорости от концентрации к гиперболической. Сходным образом ведет себя катепсин С [2926].

Наконец, следует отметить аллостерическое действие C1q-фактора системы комплемента на активацию C1s–C1r-факторов [2927] и сходное действие стрептокиназы на активацию плазминогена [2928].

5.12. Автолиз

Автолитическое расщепление ферментов – свойство, присущее только протеазам. Оно заключается в катализе протеазой гидролиза амидных связей в молекулах того же фермента, подвергшегося частичной или полной денатурации. В простейшем случае кинетика инактивации фермента за счет автолиза описывается схемой:



где E_D – денатурированная форма фермента, а соответствующее кинетическое выражение для скорости инактивации будет [2478]:

$$\frac{d[E]_N}{dt} = k_t K_D ([E_N])^2.$$

Можно показать, что начальная скорость денатурации

$$v_0 = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{1}{t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_t},$$

где $[E]_t$ — концентрация E_N в момент времени t . Из зависимости $\frac{1}{t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_t}$ от t , экстраполируя к $t=0$, можно получить значение $k_0 = k_t K_D$ — значение эффективной константы скорости денатурации. Для α -химотрипсина эти величины оказались равными $9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при температуре 40°C и $100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при температуре $49,5^\circ\text{C}$ (рН 7,6) [2478]. Как видно из уравнения для скорости инактивации, последняя зависит от квадрата начальной концентрации фермента, поэтому скорость автолиза очень быстро увеличивается с увеличением концентрации растворов протеаз. Заметный автолиз трипсина происходит даже при хранении лиофилизированного фермента [292]. Автолиз особенно эффективно происходит в оптимуме рН действия фермента, однако отмечены случаи автокаталитической инактивации и при значениях рН, сильно отличающихся от оптимальных [2929]. Даже при очистке трипсина на сульфэтилсефадексе при рН 2,6 наблюдается заметный автолиз [2930]. Автолиз пепсина весьма заметно происходит при его кристаллизации [2931] и в растворе при различных воздействиях (рис.89) [2932]. Скорость автолиза отличается у ферментов разных групп. Так, экзопептидазы (карбоксипептидаза А и др.) довольно устойчивы в отношении самопереваривания [1213]. Более того, разные изоферменты химозина заметно различаются по скорости автолиза [2933,2934].

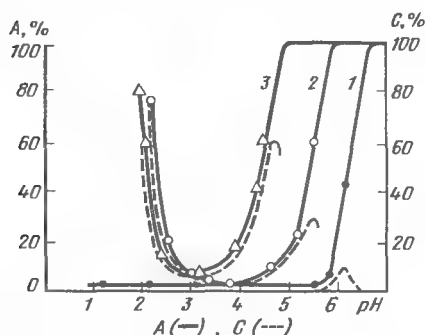


Рис.89. pH-Зависимость активности (A) и концентрации (C) растворимых в трихлоруксусной кислоте продуктов автолиза пепсина [2932]

1 — в водном растворе;
2 — в 8 М мочеvine;
3 — в 4 М гуанидинхлориде

Автолиз может ускоряться различными соединениями. Так, дитиотриэтол и дитиозритритол стимулируют автолиз папаина, тогда как меркаптоэтанол на этот процесс влияния не оказывает [2934]. Автолиз химотрипсина промотирует красителем голубым Эванса [2935].

Ранее считалось, что автолиз может приводить к фрагментам протеаз, сохраняющим каталитическую активность (см., например: [2936]). Действительно, многие случаи автокаталитического расщепления ведут к активным формам (например, превращение δ -химотрипсина в α -химотрипсин). Однако глубокий автолиз неизбежно ведет к инактивации фермента.

5.13. Заключение

Каталитическая активность амидгидролаз изменяется под действием самых разных факторов. Два из них наиболее существенны: изменение зарядов ионизирующихся групп фермента, особенно групп активного центра, и конформационные перестройки белковой глобулы. Уже при активации зимогенов образование ката-

литически активного белка связано в первую очередь с изменением конформации, приводящим к формированию связывающего субстрат участка активного центра. Изменение pH, температуры, ионной силы раствора также приводят к локальным или более общим конформационным перестройкам молекулы фермента. Таким образом, конформационная лабильность является, по-видимому, неременным условием активности и регуляции амидгидролаз.

Существование большого числа весьма специфических ингибиторов позволяет не только изменять активность амидгидролаз, но и исследовать структуру активных центров, в том числе и взаимное расположение функционально важных групп. Это особенно ценно при кристаллографическом изучении ферментов.

ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

В предыдущих главах мы познакомились со структурой и свойствами участников процесса ферментативного гидролиза амидной связи, а также с важнейшими экспериментальными фактами, касающимися самого процесса. В этой и следующей главе мы проследим детально за всеми событиями, происходящими в ходе катализа, анализируя их с точки зрения структуры взаимодействующих веществ. К сожалению, в настоящее время это можно сделать лишь на ограниченном числе примеров, для которых, главным образом благодаря успехам кристаллографии белков, имеется достаточно детальная картина происходящих событий.

В основе всех представлений современной энзимологии лежит идея об образовании фермент-субстратного комплекса. Эта идея проверена и получила подтверждение многими прямыми и косвенными методами, важнейшие из которых были уже рассмотрены выше и будут рассмотрены в ходе дальнейшего изложения.

6.1. Силы взаимодействия

6.1.1. Дисперсионные взаимодействия

При сближении двух атомов между ними возникают два типа взаимодействий — силы отталкивания, обусловленные взаимодействием электронных оболочек, и силы притяжения, или дисперсионные силы [2937]. Последние пропорциональны 6-й степени расстояния между атомами, тогда как силы отталкивания пропорциональны 12-й степени расстояния. Полная потенциальная энергия взаимодействия выражается уравнением:

$$U = A/r^{12} - B/r^6, \quad (1)$$

где A и B — константы (рис.90).

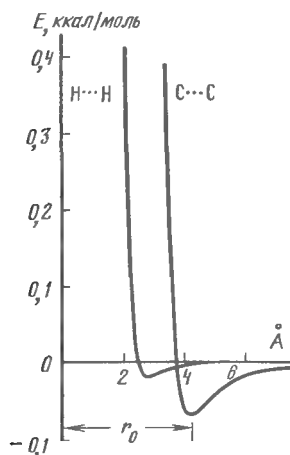


Рис.90. Потенциальная энергия взаимодействия между двумя атомами водорода и двумя (тетраэдрическими) атомами углерода в молекуле белка
 r_0 — Ван-дер-ваальсово межатомное расстояние

Силы притяжения обусловлены взаимным индуцированием в нейтральных атомах или молекулах так называемого мгновенного дипольного момента, определяемого флуктуациями электронной плотности. Расстояние, соответствующее минимуму потенциальной энергии, называется Ван-дер-ваальсовым радиусом атома (табл. 66).

В сложных, и особенно белковых, молекулах эти расстояния могут быть несколько меньшими [2940]. Энергия дисперсионного взаимодействия весьма невелика (см. табл.66) [2939]. Однако наличие в молекуле белка или в области

Таблица 66. Ван-дер-ваальсовы радиусы атомов и групп и энергия взаимодействия между одноименными атомами [2938,2939]

Атом или группа	Радиус, Å	Энергия, ккал/моль
H	1,4	0,0186
O (в OH)	1,5	
O (в CO)	1,7	0,0519
O ⁻ (в COO ⁻)	1,8	
C (тригональный)	1,7	0,4519
S	1,8	
N (амид):	2,0	0,1366
N ⁺ (ImH ⁺)	1,55	
CH (тетраэдрический)	2,1	0,0679
CH (ароматический)	1,8	

контакта фермента и субстрата большого числа взаимодействующих атомов делает вклад дисперсионных сил в общую энергию связывания довольно значительным (см. разд. 6.3).

6.1.2. Гидрофобные взаимодействия

Гидрофобные взаимодействия возникают за счет перестройки системы водородных связей воды вблизи неполярной гидрофобной группы.

В результате такой перестройки локальная упорядоченность растворителя увеличивается, что приводит к уменьшению энтропии системы. Чтобы компенсировать это неблагоприятное изменение энтропии, вода вытесняет гидрофобную молекулу или группу в гидрофобную область белка. Таким образом, возникают гидрофобные взаимодействия (см. обзоры: [2941-2944]).

Свободную энергию гидрофобного взаимодействия можно определить из константы равновесия при распределении данного вещества между водой и некоторым растворителем, например *n*-октанолом [2942]:

$$\Delta G_h = -RT \ln \frac{[A]_{\text{окт}}}{[A]_w}. \quad (2)$$

Это взаимодействие характеризуют также константой гидрофобности Ганча:

$$\pi = \lg([A]_{\text{окт}}/[A]_w). \quad (3)$$

Значения ΔG_h и π для аминокислот приведены в табл. 9.

Детальный анализ растворения углеводов в воде показал [2945], что вклад изменения энтальпии в свободную энергию гидрофобных взаимодействий все же довольно большой. В расчете на одну CH₂-группу $\Delta H_o = -0,57$ ккал/моль, а $T\Delta S = +0,34$ ккал/моль. Гидрофобность изменяется с изменением площади поверхности молекулы, взаимодействующей с водой [2943,2944]. Эмпирически установлено, что изменение энергии гидрофобного взаимодействия на 1 Å² площа-

ди составляет 20–25 кал/моль.

Микросреда активных центров многих ферментов существенно менее полярна и обладает меньшей диэлектрической проницаемостью, чем вода. Это следует из данных по изменению спектров красителей при их адсорбции ферментами [2946]. Диэлектрическая проницаемость микросреды активного центра химотрипсина оценивается величиной $\epsilon < 10$, т.е. близкой к диэлектрической проницаемости октанола. Однако гидрофобность активных центров амидгидролаз часто оказывается выше, чем гидрофобность модельной среды – октанола. В разд. 4.3.2.2 был приведен ряд примеров корреляций констант скорости реакции и гидрофобности боковых цепей субстратов с наклоном, превышающим единицу. Такая же зависимость наблюдается для значений K_i некоторых ингибиторов (например, замещенных форманилидов [2000]). Это обусловлено тем, что в воде гидрофобные взаимодействия возникают только при введении неполярного соединения, тогда как в ферменте гидрофобная полость сохраняется и в отсутствие гидрофобного лиганда. Поэтому в зависимости от структуры лиганда и фермента может реализоваться больший выигрыш в энергии за счет гидрофобных взаимодействий, чем при переносе вещества из воды в октанол.

6.1.3. Водородная связь

Характеристики водородных связей для ряда модельных амидсодержащих соединений были рассмотрены в разд. 1.2.3. (см. также обзор: [72]). Здесь необходимо подчеркнуть, прежде всего, что энергия водородной связи сильно уменьшается в полярных средах. Вклад незаряженной водородной связи в энергию комплексообразования лиганда с белком оценивается в 0,5–1,8 ккал/моль [2947].

Преимущественный вклад в свободную энергию образования водородной связи вносит энтальпия (см. табл. 4). Это справедливо для соединений, образующих одну водородную связь, так как при этом изменяются лишь трансляционные степени свободы. Для соединений с двумя и большим числом водородных связей при их образовании теряются также и вращательные степени свободы и энтропийный вклад становится больше. Отмечено [2948] существование компенсационной зависимости ΔH_0 и ΔS_0 при образовании водородной связи.

Прочность водородной связи зависит от значений pK_a , образующих связь соединений, и соответственно от электронных свойств заместителей [2949, 2950], причем электроноакцепторные заместители, например в фенолах, увеличивают прочность Н-связи (рис. 91).

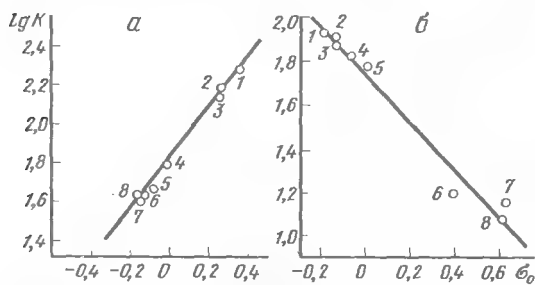


Рис. 91. Влияние заместителей на константы ассоциации за счет водородных связей в фенолах (а) и пиридинах (б) в четыреххлористом углеводе [2950]

Заместители в феноле (а):
 1- $M-Cl$; 2- $n-Cl$; 3- $n-Cl$;
 4- H ; 5- $M-CH_3$; 6- $n-CH_3$;
 7- n -трет-бутил; 8- $n-CH_3$;
 в пиридине (б):
 1- 4-трет-бутил; 2- 4- CH_3 ;
 3- 4- C_2H_5 ; 4- 3- CH_3 ;
 5- H ; 6- 3- Br ; 7- 3- CN ;
 8- 4- CN

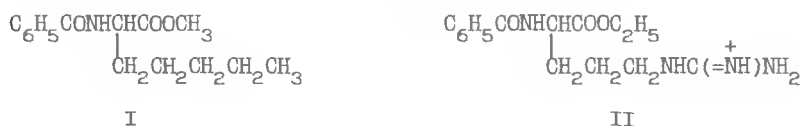
6.1.4. Электростатические взаимодействия

Эти взаимодействия являются наиболее дальнедействующими при образовании фермент-субстратных комплексов, поскольку их энергия обратно пропорциональна 1-й степени расстояния между ионами (см. обзор: [2410, гл.71]).

В водном растворе ионы сольватированы, причем энергия сольватации весьма высока. Так, для карбоксильной группы в воде она составляет около 65 ккал/моль [2939]. При возникновении ионной пары между заряженными группами белка и субстрата освобождается сольватирующая вода, что приводит к увеличению энтропии системы. Однако молекулы воды внутри белковой глобулы или в области белок-белковых контактов могут служить "мостиками" электростатических взаимодействий, давая значительный вклад в стабилизацию комплексов [2951].

Вклад ионных взаимодействий в общую энергию стабилизации комплекса оценить довольно трудно. Было показано [2306], например, что локализованная внутри глобулы α -химотрипсина ионная пара, образованная карбоксилат-ионом остатка Asp194 и аммонийной группой остатка Ile16, дает вклад в стабилизацию структуры фермента около 3 ккал/моль.

Оценить эту величину из сравнения K_s или K_i субстратов и ингибиторов, как правило, затруднительно, по-видимому, вследствие того, что часть энергии взаимодействия расходуется на конформационное изменение фермента. Так, значение K_s для двух субстратов трипсина



равно соответственно 0,1 и 262 мМ, т.е. заряд в соединении II дает отрицательный вклад в связывание. Однако разница в свободных энергиях активации (по k_2/K_s) для пары AcLysOMe и AcHepOMe составляет 5,9 ккал/моль [1979], что в значительной степени может быть отнесено к ионному взаимодействию. Это согласуется с результатами, полученными при направленном мутагенезе трипсина [2952]. Замена остатка Asp189 в субстратсвязывающем кармане фермента на остаток Ser снижает k_{cat} по отношению к Lys- и Arg-содержащим субстратам на 5 порядков, тогда как K_m увеличивается лишь в 2-6 раз. Взаимодействие заряженной группы субстрата с карбоксилат-ионом остатка Asp189 в трипсине дает вклад в свободную энергию связывания около 4 ккал/моль.

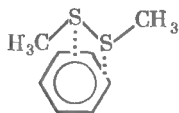
6.1.5. Другие типы взаимодействий

Между ароматическими циклами и между этими циклами и амидной группой возможны донорно-акцепторные π - π -взаимодействия, в том числе и образование комплексов с переносом заряда. Модельные комплексы такого типа исследованы в работах [2953-2955]. В межмолекулярных комплексах с переносом заряда в органических растворителях константа ассоциации очень невелика (0,4-1,2 M^{-1}), а энтальпия комплексообразования составляет -0,5-2,5 ккал/моль.

Теоретический конформационный анализ показал [143] возможность взаимодействия ароматических колец фенилаланина с пептидной связью в пептидах ти-

па AcPhePheNHMe. Энтальпия такого взаимодействия составляет около -4 ккал на моль.

Было показано [2956,2957], что ароматические группы могут взаимодействовать с S-S-связью и атомами серы в белках. Энергия взаимодействия бензола с диметилдисульфидом составляет -3,3 ккал/моль:



6.2. Кинетика комплексообразования

6.2.1. Теория

Движение молекул реагирующих веществ в растворе определяется скоростью диффузии, зависящей от размера молекул. Для незаряженных молекул сферической формы константа скорости диффузионно-контролируемой реакции двух молекул с радиусами R_1 и R_2 , имеющих коэффициенты диффузии D_1 и D_2 , будет [2958, 2959]:

$$k_d = 4\pi(R_1 + R_2)(D_1 + D_2)N/1000, \quad (4)$$

где N - число Авогадро. Так как коэффициент диффузии выражается как

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (5)$$

где η - вязкость раствора, то выражение для константы скорости можно записать в виде:

$$k_d = \frac{2RT(R_1 + R_2)}{3000\eta R_1 R_2}. \quad (6)$$

Учет электростатических взаимодействий (в разбавленных растворах) может быть сделан на основе уравнения Дебая-Хюккеля [2960]:

$$\lg \frac{k_d^e}{k_d} = z_1 z_2 \sqrt{\mu}, \quad (7)$$

где z_1 и z_2 - заряды взаимодействующих частиц; μ - ионная сила.

Это уравнение применимо при относительно высокой ионной силе ($\mu > 0,01$ [2961]) и для растворов белков - вблизи изоионной точки, где общим зарядом белковой глобулы можно пренебречь. Вдали от изоионной точки значительное влияние на скорость диффузионно-контролируемых реакций будет оказывать общий заряд белковой глобулы, а не только локальный заряд в радиусе соударения. Учет этого обстоятельства приводит [2962] к довольно сложному уравнению, графическое представление которого для частного случая ($R_1 = 25 \text{ \AA}$ и $R_2 = 3 \text{ \AA}$) показано на рис.92 [2963]. Модифицированное уравнение (4), учитывающее эти и некоторые другие факторы было предложено в работе [2964].

Рис. 92. Зависимость фактора эффективности $f = k_a^s/k_a$ от произведения зарядов белка и субстрата (влияние общего заряда белковой глобулы) Ионная сила: 1 — в отсутствии NaCl; 2 — 10^{-3} М; 3 — 10^{-2} М NaCl [2963]

Все эти данные позволяют оценить константу скорости диффузионно-контролируемых реакций как $k_a = 10^8\text{--}10^{10} \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [2965].

Вязкость многих растворителей зависит от температуры [2966]:

$$\eta = A e^{-\frac{\phi}{RT}} \quad (8)$$

Подставляя это выражение в уравнение (6) и логарифмируя, получим:

$$k_a = \ln A + \ln T - \frac{\phi}{RT} \quad (9)$$

Отсюда видно, что зависимость k_a от температуры определяется в основном изменением вязкости. С этим согласуются прямые измерения вязкости раствора на каталитические константы ферментативной реакции (см. разд. 4.4). Величина ϕ лежит в пределах 1–5 ккал/моль. Примерно в этом же диапазоне лежат свободные энергии активации диффузионно-контролируемых реакций.

6.2.2. Экспериментальные данные

Как видно из данных табл. 67, скорость ассоциации во многих случаях сопоставима с диффузионно-контролируемыми величинами, хотя для некоторых комплексов наблюдаются отклонения, которые нельзя объяснить вкладом электростатических взаимодействий. Особенно низкие скорости, наблюдаемые для взаимодействия родамина 6G или димеризации химотрипсина, по-видимому, обусловлены лимитирующей стадией конформационного изменения белка [2565]. Скорости конформационных изменений лежат в области $10^2\text{--}10^4 \text{ с}^{-1}$ [2979].

Другая причина заниженных по сравнению со скоростью диффузии скоростей ассоциации может быть связана со ступенчатым ее протеканием. Подробнее этот вопрос будет разобран ниже.

Имеется очень мало данных о температурной зависимости скорости ассоциации. Было показано [2975], что при ассоциации субтилизина BPN' с белковым ингибитором наблюдается изменение свободной энергии активации почти полностью определяется энтальпией активации ($\Delta G^\ddagger = 8,91$ ккал/моль и $\Delta S^\ddagger = 2,4$ э.е.).

6.2.3. Стадийность комплексообразования

Появляется все больше данных о том, что белок-лигандные взаимодействия происходят в две или несколько стадий. Это вполне понятно, так как такое взаимодействие сопровождается процессами десольватации реагирующих молекул, образованием большого числа нековалентных связей и часто конформационными пе-

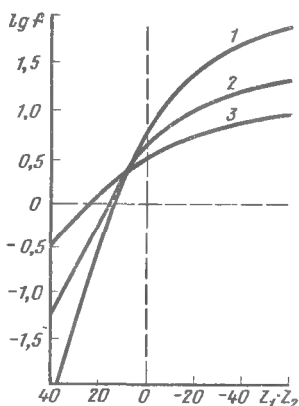
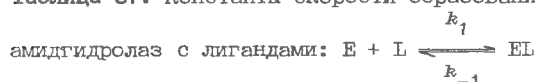


Таблица 67. Константы скорости образования и распада комплексов



Фермент	Лиганд*	k_1 , $M^{-1}c^{-1}$	k_{-1} , c^{-1}	Литературный источник
Химотрипсин	FATrpNH ₂	$6,2 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^3$	[2305]
	AcPhepNA	$1,5 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^3$	[2047]
	AcTrpONp	$1,3 \cdot 10^8$ ($6 \cdot 10^7$)	$3,5 \cdot 10^3$ ($6 \cdot 10^4$)	[2967, (2297)]
	CF ₃ CO-D-TrpOH	$1,5 \cdot 10^7$	—	[2968]
	Профлавин	$1,5 \cdot 10^8$	$2,15 \cdot 10^3$	[2969]
	Родамин 6G	$1,2 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{-3}$	[2565]
	BPTI	$1,2 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^3$	[2970]
	Химотрипсин	$3,7 \cdot 10^3$	0,68	[2971]
Трипсин	BzArgpNA	$\approx 10^6$	—	[2972]
	SBTI	$8,2 \cdot 10^6$ ($6,8 \cdot 10^6$)	($2,2 \cdot 10^{-4}$)	[2973, (2974)]
	BPTI	$1,1 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	[2974]
	LBTI	$1,4 \cdot 10^6$	—	[2973]
	OTI	$2,7 \cdot 10^6$	—	[2973]
Ангидро-трипсин	BPTI	$7,7 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^{-8}$	[2974]
	SBTI	$4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	[2974]
Субтилизин BPN'	SSI	$3,1 \cdot 10^6$	—	[2975]
Папаин	ZLyspNA	$2,7 \cdot 10^6$	$0,27 \cdot 10^3$	[2522]
Пепсин	DnsPhePheOpp	$> 1 \cdot 10^6$	—	[2976]
	Пепстатин	$7 \cdot 10^5$	—	[2977]
Термолизин	Фосфоамидон	$\approx 5 \cdot 10^{-3}^{**}$	—	[2978]

*FA — фуроилакрилоил; ONp — *n*-нитрофениловый эфир; BPTI — бычий панкреатический трипсиновый ингибитор; LBTI — трипсиновый ингибитор из лимских собов; SSI — белковый ингибитор субтилизина; Opp — 4-пиридинопропиловый эфир; SBTI — соевый трипсиновый ингибитор; pNA — *n*-нитроанилид; OTI — овомукоид куриных яиц.

**Константа скорости инактивации фермента псевдопервого порядка (c^{-1}), оценка из графика [2978].

рестройками как белка, так и лиганда. Осуществление всех этих процессов режиме диффузионно-контролируемой реакции представляется маловероятным.

Как отмечалось в предыдущем разделе, уже в случае двухстадийной реакции комплексобразования наблюдаемая скорость может быть ниже, чем скорость контролируемых диффузией процессов.

Действительно, в случае процесса



константа скорости образования комплекса EL^* в условиях $[E]_0 \ll [S]_0$ дается уравнением:

$$k = \frac{\frac{k_1}{k_{-1}} k_2 [S]_0}{1 + \frac{k_1}{k_{-1}} [S]_0} + k_{-2}.$$

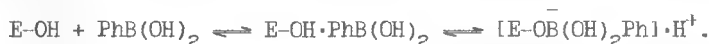
Если распадом комплекса EL^* можно пренебречь, то при низких концентрациях лиганда ($k_1/k_{-1}[S]_0 \ll 1$) наблюдаемая константа скорости второго порядка образования этого комплекса будет:

$$k = \frac{k_1}{k_{-1}} k_2 = \frac{k_2}{K_s}, \quad \text{где } K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}.$$

Таким образом, если даже первая стадия проходит с диффузионно-контролируемой скоростью ($k_1 = 1 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$), а величина K_s лежит в области $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, наблюдаемые константы скорости второго порядка, равные в большинстве случаев $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (см. табл.67), могут быть следствием того, что вторая стадия (k_2) проходит с константой скорости около $10^3 - 10^4 \text{ с}^{-1}$. Эти величины существенно ниже, чем скорости десольватации модельных соединений ($10^8 - 10^{11} \text{ с}^{-1}$ [2980, 2981]), но лежат в области типичной для констант скоростей конформационных изменений [1735, 2979]. Если $k_1[S]_0/k_{-1} \gg 1$, то $k = k_2 + k_{-2}$ и наблюдаемая константа скорости может соответствовать k_2 (если $k_{-2} \ll k_2$) или k_{-2} .

К сожалению, имеется мало данных о величинах k_2 и k_{-2} для типичных субстратов амидгидролаз (табл.68). В большинстве случаев такие исследования проводились с плохими субстратами или ингибиторами. Кроме данных, приведенных в табл.68, имеются качественные результаты, свидетельствующие о стадийности образования комплексов с амидгидролазами [2972, 2976, 2992-2997] и данные для ферментов других классов и неферментных белков (см., например: [2998-3003]).

Структурные различия комплексов EL и EL^* в большинстве случаев остаются неясными. Так, при взаимодействии субтилизина с арилборными кислотами имеются обоснованные данные [2864] о том, что первый комплекс является сорбционным, тогда как второй – продукт солеобразования борнокислого остатка и гидроксильной группы серина активного центра:



Во многих случаях регистрируются конформационные изменения фермента (например, с арсанилазотирозинкарбоксипептидазой А), ступенчатое вытеснение красителя (пепсин-пепстатин) или изменение флуоресценции субстрата (папаин, трипсин).

Таблица 68. Константы скорости стадий образования и распада комплекса EL^* (схема 10)

Фермент	Лиганд*	Условия: $t^{\circ}C$ (pH)	k_2 , c^{-1}	k_{-2} , c^{-1}	Литературный источник
Химо-трипсин	FATrpNH ₂	15(6,7)	1,5**	30	[2982]
	Dns-D-TrpOEt	-	19	9	[2983]
	Профлавин	(8,4)	500	7000	[2984]
Трипсин	DnsArgOMe	21(7,1)	≈3	0,6	[2985]
	Лейпептин	-	166	0,0017	[2986]
	STI	-	1580	750	[2987]
Субтили-зин BPN	PhB(OH) ₂	15(6,5)	2420	262	[2864]
	m-NO ₂ C ₆ H ₃ B(OH) ₂	15(6,5)	332	24,6	[2864]
	SSI	25(7)	774	-	[2975]
Папаин	MnsGlyValGlu-LeuGly	25(6,5)	4000	15	[1820]
	Mns(Gly) ₂ Val-GluLeuGly	25(6,5)	2000	15	[1820]
	ZLyspNA	-30(-) 60% Me ₂ SO	0,91	1·10 ⁻⁵	[2522]
Пепсин	Пепстатин	25(5)	600	≈0	[2977]
Фактор C1s компонента	C1-ингибитор	-	3,5·10 ⁻⁴	-	[2988]
Карбокси-пептидаза А (арсанилазо-Tyr248)	HGlyPheOH	25(8)	3250	100	[2989]
	HGlyTyrOH	25(8)	4030	271	[2989]
	HGlyIleOH	25(8)	1970	895	[2989]
	HPheOH	25(8)	1156	1746	[2989]
Термолизин	P-LeuTrpOH	-	900	2,5·10 ⁻³	[2990]
	Талопептин	-	70	6,3·10 ⁻⁴	[2990, 2991]

*Сокращения см. табл.67, а также: STI - ингибитор трипсина из стрептомицетов; Mns - мансил; P - (OH)₂P(=O)-.

**См., однако: [2515].

Во всяком случае, первый этап взаимодействия - это неполная "подстройка" фермента и лиганда. Для истинных субстратов амидгидролаз, очевидно, конечный комплекс (EL^* или ES^*) должен быть продуктивным фермент-субстратным комплексом. Первый же комплекс может быть результатом "заякоривания" субстрата ферментом по участку наибольшей специфичности, например участку первичной специфичности. Тогда можно себе представить, что вторая стадия заключается в реализации вторичных взаимодействий (вторичной специфичности) и она может сопровождаться конформационными перестройками, вызывающими изменение структуры фермент-субстратного комплекса. Следствия таких представлений для понимания специфичности и эффективности катализа амидгидролазами будут изложены в разд.8.9.

6.3. Термодинамика

Стабильность фермент-субстратного комплекса определяется изменением свободной энергии комплексообразования

$$\Delta G_0 = -RT \ln \bar{K}_s,$$

где $\bar{K}_s = 1/K_s$, константа ассоциации фермента и лиганда:



Как уже отмечалось, определяемые в кинетическом эксперименте константы Михаэлиса во многих случаях не тождественны константам диссоциации фермент-субстратных комплексов. Последние можно определить независимым способом, например методами равновесного диализа, гель-фильтрации, по изменению спектральных характеристик фермента или субстрата при их взаимодействии [1661]. Во всех случаях необходимо выбирать условия, когда химическое превращение субстрата не происходит.

Если, как это показано в предыдущем разделе, взаимодействие фермента и субстрата происходит ступенчато, то определяемая константа ассоциации (K'_s) может быть эффективной величиной. В условиях $[E]_0 \ll [S]_0$ для схемы



эта величина будет:

$$K'_s = \frac{K_s}{1 + K_s^*}, \quad \text{где } K_s^* = \frac{[ES^*]}{[ES]}.$$

В том случае, когда равновесие сильно смещено в сторону ES^* ($K_s^* \gg 1$) $K'_s = K_s/K_s^*$, если же равновесие смещено в сторону комплекса ES ($K_s^* \ll 1$), то $K'_s = K_s$.

Таким образом, наблюдаемое изменение свободной энергии может в зависимости от положения равновесия отражать или полное изменение в системе, приводящее к образованию комплекса ES^* , или же только частичное изменение, связанное с образованием комплекса ES .

В связи со сказанным интересно рассмотреть ситуацию со связыванием субстратов пепсина. Для этого фермента не обнаружено каких-либо кинетически значимых стадий между комплексом Михаэлиса и стадией химического превращения [1749, 3004], т.е. величина $K'_m = K'_s$. Многие субстраты этого фермента имеют практически одинаковые значения $K'_m \approx 1 \cdot 10^{-3}$ М при значительном различии в величинах k_{cat} (см. табл.39), т.е. несмотря на значительные различия в структуре наблюдаемая стабильность их комплексов с ферментом практически одинакова. Данные по температурной зависимости K'_m [1907] показывают, что наблюдается небольшое систематическое увеличение энтальпии ассоциации и компенсирующее положительное изменение энтропии при переходе от "медленных" субстратов к "быстрым". В целом связывание субстратов определяется значительным положительным изменением энтропии, что можно трактовать [1375] как следствие процесса десольватации.

Эти данные хорошо согласуются с представлением о стадийности комплексо-

образования в условиях, когда $K_s^* < 1$. Поскольку все исследованные субстраты имеют одну и ту же группу в участке первичной специфичности [Phe(NO₂) или PheI, напрашивается вывод о том, что в комплексе ES реализуются взаимодействия в основном только этого фрагмента субстрата с ферментом. Тогда остальные, вторичные, взаимодействия должны реализоваться в продуктивном комплексе (ES^{*}), который быстро превращается в продукты реакции. Различия в скорости превращения и будут мерой вторичных взаимодействий. В разд.8.8 мы вернемся к анализу такого "запасания" свободной энергии для понижения активационного барьера химической стадии реакции, здесь же проанализируем вклад вторичных взаимодействий в катализ на примере двух соединений [1878]:

$$\text{ZGlyGlyPhePheOpp с } k_{\text{cat}}/K_m = 1,78 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \text{с}^{-1} \text{ и}$$

$$\text{ZAlaAlaPhePheOpp с } k_{\text{cat}}/K_m = 7,05 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{с}^{-1}.$$

Отношение этих констант соответствует изменению свободной энергии активации на 2,2 ккал/моль, что близко к вкладу гидрофобных взаимодействий (см. разд. 6.1.2) двух метильных групп, реагирующих с подцентрами S₂ и S₃ активного центра пепсина. Однако если в этих подцентрах (или других) происходят специфические взаимодействия (например, электростатические), то вклад вторичных взаимодействий может быть велик и может реализоваться ситуация, когда $K_s^* > 1$ [3005].

Вклад различных взаимодействий в свободную энергию, энтальпию и энтропию комплексообразования различен и зависит не только от типа взаимодействия, но и от структуры лиганда в целом, а также от энергетики сопутствующих связыванию процессов изменения сольватации, pK_a групп белка, конформационного состояния и конформационных изменений фермента.

Гидрофобные взаимодействия, как правило, вносят очень малые изменения в энтальпию и контролируются главным образом энтропией ассоциации (см., например: [2470,3006]). Образование водородных связей сопровождается изменением энтальпии.

Процессы десольватации приводят к положительному изменению энтропии за счет увеличения числа трансляционных степеней свободы системы при высвобождении молекул воды. Подробно вклад различных факторов в энергию связывания ингибиторов термолизином рассмотрен в работах [2596,3007].

Десольватация играет важную роль при взаимодействии амидгидролаз с белковыми ингибиторами. Во многих случаях такое взаимодействие сопровождается положительным изменением энтропии [3008,3009] (см., однако: [3010]). В случае небольших лигандов основную роль играют факторы, приводящие к отрицательному изменению энтропии (см. табл.57).

Имеется много работ, в которых энергия белок-лигандного взаимодействия рассчитывалась методами молекулярной механики или квантовой химии (см., например: [153,3011-3015]). Получаемые значения энтальпии связывания сильно зависят от метода расчета (см. также разд.6.6).

Суммарный тепловой эффект связывания лигандов зависит от pH среды и, очевидно, от ионного состояния групп белка в данных условиях. Это видно, например, из сравнения энтальпии комплексообразования с химотрипсином ряда ингибиторов при значениях pH 7,8 и 5,6 [2467,2468].

Вычленив вклад в термодинамические параметры комплексообразования кон-

формационных изменений белка – весьма сложная задача. В этой связи интересно рассмотреть данные [2469,3016,3017], в которых сравнивалась термодинамика ассоциации различных лигандов с нативными и модифицированными по группам активного центра (His57 и Ser195) химотрипсином и трипсином.

Во-первых, связывание специфических субстратоподобных ингибиторов характеризуется значительно большим отрицательным изменением энтропии, чем связывание неспецифических ингибиторов. Во-вторых, дегидратация Ser195 или метилирование His57 приводит к существенному положительному изменению энтропии ассоциации, что, по-видимому, объясняется большей подвижностью лигандов в комплексах с модифицированными белками и отсутствием в таких белках индуцированных лигандами конформационных изменений [2469]. Отмечено также [3018], что связывание лигандов с мономерной формой химотрипсина значительно более эффективно, чем с димером.

Таким образом, изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии ассоциации зависят от очень многих факторов, которые не всегда поддаются учету.

Ниже (см. разд.6.6) мы попытаемся оценить полную энергию связывания фермента и субстрата на основании данных о взаимодействиях, реализующихся в комплексе, которые получены с помощью рентгеноструктурного анализа.

6.4. Конформационные изменения

Связывание субстратов и ингибиторов ферментами часто приводит к конформационным изменениям белковых молекул, которые можно регистрировать спектральными методами (изменения в УФ-спектрах, спектрах флуоресценции, кругового дихроизма и т.п.), термохимическими методами (по изломам на графиках Аррениуса) и методами рентгеноструктурного анализа. Эти изменения могут быть очень небольшими и затрагивать лишь локальные участки молекулы белка, особенно ориентацию боковых цепей его аминокислотных остатков (см., например: [1375,1378,3019–3022]), а могут также быть связаны с изменениями взаимной ориентации доменов в белках [3023].

Динамическая подвижность белков – свойство белковой молекулы, не зависящее от наличия лиганда. Изменение конформации, индуцируемое лигандом, по-видимому, происходит в рамках тех состояний, которые разрешены и для свободной белковой молекулы. Например, расчеты методом атом-атомных потенциалов [3024] показывают, что боковая цепь остатка Ser195 в α -химотрипсине фиксируется в положении с $\chi_1 = 90^\circ$ за счет водородной связи с молекулой воды. При связывании субстрата и вытеснении воды боковая цепь этого остатка приобретает практически полную свободу вращения вокруг связи $C_\alpha - C_\beta$ в пределах χ_1 от -120 до $+120^\circ$ (рис.93). Глобальный минимум энергии этого остатка (при $\chi_1 = 90^\circ$) лишь на 2–3 ккал/моль

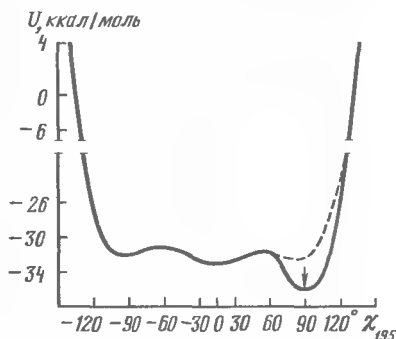


Рис.93. Зависимость конформационной энергии боковой цепи Ser195 в α -химотрипсине от угла вращения вокруг связи $C_\alpha - C_\beta$ (χ_1) [3024]

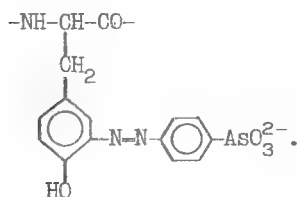
ниже, чем энергии других конформаций.

Вообще, поскольку конформации аминокислот в белках совпадают с конформациями изолированных остатков, введение относительно небольшого лиганда вряд ли может внести существенные изменения.

Изучение спектров КД комплексов показывает, что обычно связывание лиганда изменяет эллиптичность в области поглощения ароматических фрагментов, но не затрагивает области поглощения пептидных групп (см., например: [3025-3027]). Исключения могут составлять некоторые рН-зависимые конформационные переходы. Так, лиганды (индол, ацетилтриптофанамид) могут смещать равновесие между активной и неактивной конформациями химотрипсина, существующее при $\text{pH} > 8$, в сторону активной формы. Это сопровождается изменением как дисперсии оптического вращения белка, так и изменением pK_a группы Ile16, что приводит к поглощению протонов из среды [3027, 3028]. Кинетика таких переходов подробно описана в работе [3029]. Сходные субстратиндуцируемые изменения наблюдались в бромелаине [3030].

Кристаллографические исследования комплексов амидгидролаз с субстратоподобными соединениями позволили идентифицировать ряд конформационных изменений, характер которых будет подробно рассмотрен в следующем разделе.

Эффективным способом регистрации конформационных изменений является введение "репортерных" меток. В качестве таких меток могут служить хромофорные группы [3030], спинные метки [3031], флуоресцентные метки [3032] и т.п. Хорошим примером использования этого подхода служит исследование карбоксипептидазы А, модифицированной азосочетанием по остатку Tyr248 с диазоарсаниловой кислотой [1964 и цит. в ней лит.]:



Арсанилазогруппа координирована в молекуле карбоксипептидазы А с ионом Zn^{2+} , что приводит к появлению интенсивной полосы при 510 нм и соответствующей полосы в спектрах кругового дихроизма. Связывание субстратов, конкурентных ингибиторов фермента, и некоторых других соединений приводит к исчезновению этой полосы вследствие конформационных изменений, нарушающих связь азогруппы с металлом. Эти исследования выявили наличие нескольких участков связывания лигандов в активном центре карбоксипептидазы. Замена в карбоксипептидазе А иона Zn^{2+} на Co^{2+} позволяет использовать изменение, происходящее в ферменте при связывании лигандов методом магнитного кругового дихроизма [3033]. Комплексы арсанилазо-(Tyr248)-карбоксипептидазы А были исследованы также методом Раман-резонансной спектроскопии [3034, 3035].

Следует отметить, что в комплексах ферментов с лигандами часто сохраняется возможность свободного вращения и перемещения групп лиганда (например: [3036]). Возможно, что поле белка, как это отмечено для кристаллического поля [3037], может даже способствовать свободному вращению.

6.5. Структура комплексов

Наиболее полную информацию о структуре комплексов ферментов с субстратами дают кристаллографические исследования. Имеются данные о структуре довольно большого числа комплексов амидгидролаз с субстратоподобными соединениями, "квазисубстратами" и ингибиторами, т.е. веществами, практически не подвергающимися химическому превращению в условиях кристаллографического эксперимента. Кроме того, известна структура ряда производных амидгидролаз, имитирующих различные стадии ферментативного катализа (табл.69).

Следует подчеркнуть, что выводы о структуре комплексов ферментов с истинными субстратами, делаемые на основе этих данных, следует воспринимать с известной осторожностью.

Таблица 69. Рентгеноструктурный анализ комплексов и производных амидгидролаз

Фермент	Лиганд или производное*	Разре- шение, σ А	R-фактор	Литера- турный источник
α -Химотрипсин	For-L-TrpOH	2,0	-	[1329]
	$n\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{-E}$	2,0	-	[1221]
	Ind-CH=CHCO-E	2,5	-	[1328]
	$n\text{-RC}_6\text{H}_3(\text{OH}-o)\text{CH=CHCO-E}$	1,9	0,203	[3038]
	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{C}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO-E}$	1,9	0,195	[2700]
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{B}(\text{OH})_2$	1,8	0,2	[3039]
	SLPI	2,3	0,19	[3040]
	BPTI (модель)	2,0	-	[3041]
	OMT-3	1,8	0,168	[3042]
Трипсин	Бензамидин	1,9	0,23	[1233]
	BPTI	1,9		[3043, 3044]
	SBTI	2,6	-	[3046]
	PSTI	1,8	0,195	[3095]
	APPA	1,4	-	[3045]
Панкреатичес- кая эластаза	TfaLysAlaNHCC ₆ H ₄ CF ₃ -n	2,5	0,21	[3047]
	AcAlaProAla	1,65	0,184	[3048]
	BocValNHCC ₆ H ₃ (M-Cl)(o-COO-E)	1,76	0,172	[3049]
	ThrProVal-N-Me-LeuTyrThr	1,8	0,190	[3050]
	AcAlaProValCF ₂ CONH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	1,78	0,16	[2887]
Лейкоцитарная эластаза	MeOSucAlaAlaProValCH ₂ -E	1,84	0,164;	[3051]
	OMT-3	1,8	0,21	[3052]
Тромбин	D-PheProArgCH ₂ -E	1,9	0,171	[3053]
Калликреин А	BPTI	2,5	0,23	[3054]
α -Литическая протеаза	BocAlaProNHCH(CHMe) ₂ B(OH) ₂	2,0	0,138	[2876]
	MeOSucAlaAlaProNHCH(R)B(OH) ₂ [R=Me, Ph и др.]	2,0- -2,15	0,142- 0,147	[3055]
Субтилизин Карлсберг	Эглин С	1,2	0,178	[3056]
Субтилизин BPN'	CI2	2,1	0,193	[3057]
	SSI	2,6	0,34	[3058]
	BzArgOH	2,5	-	[3059]
	ZGlyGlyTyrOH	2,5	-	[1330]
	AcAlaGlyPheCH ₂ -E	2,5	-	[3060]

Таблица 69 (продолжение)

Фермент	Лиганд или производное*	Разре- шение, с А	R-фактор	Литера- турный источник
Протеаза А <i>Streptomyces griseus</i>	PheAlaLysCH ₂ -E	2,5	0,229	[3061]
	C ₆ H ₅ B(OH) ₂	2,5	-	[2875]
	Химостатин	1,8	0,123	[3062]
	AcProAlaProPheOH	1,8	0,133	[3063]
	AcProAlaProTyrOH	1,8	0,122	[3063]
Протеаза В <i>Streptomyces griseus</i>	AcProAlaProPheCHO-E	1,8	0,142	[3063, 3064]
	BocAlaGlyPheCH ₂ -E	-	-	[3065]
Термитаза	Эглин С	1,98	0,165	[3067]
Протеиназа К	ZAlaAlaCH ₂ -E	2,2	0,22	[3068]
Папаин	E-64	2,4	0,233	[3069]
	E-64с	2,5	0,269	[2735]
	Цистатин (модель)	-	-	[2797]
Пепсин	HPh(I ₂)TyrOMe	3,0	-	[3070]
Пеницилло- пепсин	IvaValValStaOEt	1,8	0,131	[3071, 3072]
	IvaValValLysaOEt	1,8	0,144	[3072]
Эндотиапепсин	ProThrGluPheCH ₂ NHPheArgGlu	2,0	0,2	[2612]
	BocPheHisNHCH(CH ₂ Ph)CH(OH)NCO ¹ LysPhe	1,8	0,16	[3073]
	BocHisProPheHisStaLeuPheNH ₂	2,2	0,17	[3074]
Ризопуспепсин	Пептатин	2,5	0,265	[3075]
	D-HisProPheHisPheCH ₂ NHPheValTyr	1,8	0,147	[3076]
Карбоксилеп- тидаза А	BzPheOH	1,8	0,187	[3076]
	F ₃ CCOCH ₂ (CH ₂ Ph)COOH	1,7	0,172	[3078]
	HGlyTyrOH (при -9°C)	1,6	0,178	[3079]
	HGlyTyrOH (с апоферментом)	2,3	-	[1288]
	BocPheCH ₂ CH(CH ₂ Ph)COOH	1,75	0,236	[3080]
	ZGlyPO ₂ NHPhe	2,0	-	[2628]
	ZAlaNHCH(CH ₃)P(OH)(=O)OCH(CH ₂ Ph)COOH	2,0	0,193	[3081]
Термолизин	PCI	2,5	0,196	[3082]
	ZPheOH	2,3	-	[3083]
	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(COOH)CH ₂ COOH	-	-	[3084]
	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ COPheOH	2,3	-	[3083, 3085]
	ValTrp	-	-	[3086]
	Ph(CH ₂) ₂ CH(COOH)ValNHCH(COOH)CH ₂ Trp	1,9	0,171	[3087]
	E-CH ₂ CON(OH)LeuOMe	2,3	0,17	[2695]
	HSCH ₂ CH(CH ₂ Ph)COGlyOH (S)	1,7	0,183	[2629]
	HSCH ₂ CH(CH ₂ Ph)NHCOCH ₂ COOH (R)	1,7	0,187	[2629]
	(HO) ₂ P(O ₂)NHLeuNH ₂	1,6	0,179	[2893]
	ZGlyPLeuLeuOH	1,6	0,177	[2728]
Фосфоамидон	ZPhePLeuAlaOH	1,7	0,17	[2728]
	Фосфоамидон	2,3	-	[3085]

Таблица 69 (окончание)

Фермент	Лиганд или производное*	Разре- шение, о А	R-фактор	Литера- турный источник
D-Ala-D-Ala пептидаза	Цефалоспорин C	2,3	0,106	[3088]

*Ind - индолил; SLPI - секреторный лейкоцитарный ингибитор протеаз; BPTI - основной панкреатический трипсиновый ингибитор; OMT-3 - третий домен овомукоиды индейки; SBTI - соевый трипсиновый ингибитор; PSTI - панкреатический секреторный трипсиновый ингибитор; APRA - *n*-амидинсфенилпро-виноградная кислота; CI2 - химотрипсиновый ингибитор 2 из зерен ячменя; SSI - субтилизиновый ингибитор из *Streptomyces*; E-64 и E-64с - см. разд.5.9.6; Sta - статин; Lysa - 4,8-диамино-3-оксиоктановая кислота; PCI - ингибитор карбоксипептидазы картофеля; GlyP и PheP - фосфорные аналоги Gly и Phe (NHCH_2PO_2).

В этом разделе мы остановимся на некоторых общих вопросах структуры комплексов амидгидролаз, а затем подробно рассмотрим отдельные примеры, касающиеся структуры комплексов представителей четырех групп рассматриваемых ферментов.

6.5.1. Конформация субстрата в активном центре

Необходимым условием образования стабильного комплекса фермента и лиганда является комплементарность взаимодействующих участков реагирующих молекул. Комплементарность можно определить [3089] как наличие в таких участках вза-

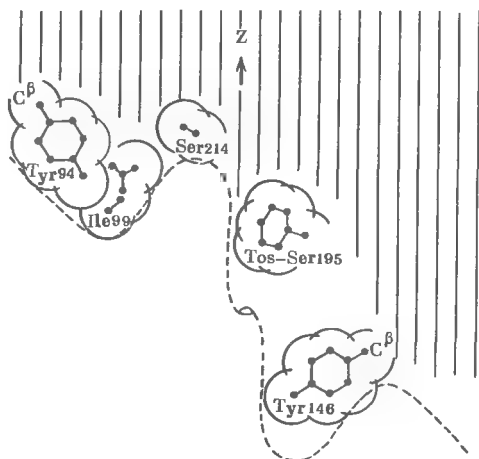
Рис.94. Участок Ван-дер-ваальсовой оболочки" [3089] молекулы α -химотрипсина

имно дополнительной Ван-дер-ваальсовой оболочки (рис.94), так что наружные части одной молекулы совпадают с внутренними частями другой.

У конформационно-жестких лигандов тип Ван-дер-ваальсовой оболочки фиксирован, однако для большинства субстратов амидгидролаз как конформация, так и, следовательно, вид оболочки могут в определенных пределах изменяться.

Возникает вопрос: насколько соответствует конформация субстратов амидгидролаз в растворе и в активных центрах ферментов?

Пределы конформационной подвижности пептидов относительно невелики - они возможны в рамках энергетически разрешенных областей, показанных на картах Рамачандрана (см. разд.1.4.2). Конформационные изменения в активных цент-



рах амидгидролаз при связывании субстратов также обычно невелики и носят локальный характер. Поэтому следует ожидать, что конформационные изменения субстрата при связывании ферментом не должны быть значительными.

Сходство конформаций производных N-ацетил-L-фенилаланина в растворе и в активном центре химотрипсина было постулировано [2029] на основе сравнения кинетики гидролиза субстратов этого фермента, имеющих ограниченную конформационную подвижность (см. рис.66). Аналогичный подход был использован [3090] для доказательства вытянутой конформации боковой цепи остатка Lys в комплексах с трипсином.

Этот вывод нашел подтверждение в исследованиях [3091] ЯМР-комплексов ацетил- и трифторацетилтриптофана с химотрипсином, резонансных Раман-спектров тиаоцилпаина и других цистеиновых протеиназ [3092,3093], а также в расчетах конформации субстратов методом атом-атомных потенциалов [3024, 3094]. Наконец, результаты кристаллографического анализа комплексов химотрипсина с субстратоподобными ингибиторами окончательно подтвердили этот вывод (табл.70). Наблюдаемые отличия в конформации основной цепи субстрата иногда бывают связаны с особенностями кристаллической упаковки белка. Так, в кристаллах комплекса химотрипсина с формилтриптофаном ориентация лиганда, по-видимому, несколько искажена из-за препятствий, создаваемых второй молекулой фермента, контактирующей с субстратсвязывающим участком [1329].

Таблица 70. Конформация основной цепи некоторых аналогов субстратов в активных центрах амидгидролаз

Фермент	Лиганд*	Угол	Двугранный угол в положении				Литературный источник
			P ₂	P ₁	P' ₁	P' ₂	
Трипсин	BPTI	φ	-70	-120	-94	-112	[3044]
		φ	154	49	170	79	
	SBTI	φ	-	-135	-89	-	[3046]
		φ	-	-115	85	-	
Химотрипсин	For-L-TrpOH	φ	-	-86	-	-	[1329, 3059]
		φ	-	3	-	-	
Лейкоцитарная эластаза	OMT-3	φ	-76	-99	-82	-104	[3052]
		φ	155	29	156	106	
Протеаза В <i>Streptomyces griseus</i>	OMT-3	φ	-69	-117	-83	-99	[3066]
		φ	159	45	153	115	
Субтилизин Карлсберг	Эглин С	φ	-61	-115	-96	-117	[3056]
		φ	143	43	169	110	

*Сокращения см. в табл.69.

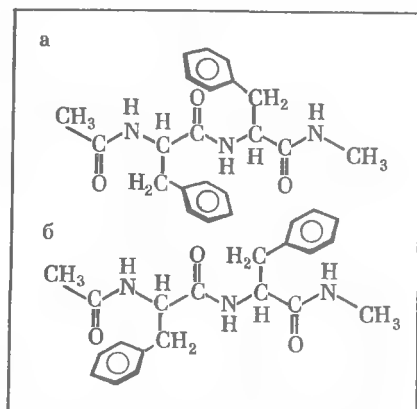
Конформации лигандов соответствуют разрешенным областям для углов φ и φ на картах Рамачандрана (ср. табл.70 и рис.7). Заметные различия в конформациях могут наблюдаться для боковых цепей, но разница в энергиях таких конформаций обычно мала. Так, ароматическое кольцо формилтриптофана при связывании поворачивается примерно на 60° по отношению к оптимальной кон-

формации в растворе [2029]. В случае субстратов пепсина оптимальной в растворе конформацией является такая, где оба ароматических кольца дипептида AcPhePheNHMe не взаимодействуют друг с другом и с пептидной связью [143].

Рис.95. Конформация AcPhePheNHMe [143]

С- конформация с параметрами: χ_1^I 180° , χ_1^{II} -60° и $\Delta G_{tot}=0,6$ ккал/моль;
 С- конформация с χ_1^I -60° , χ_1^{II} 180° и $\Delta G_{tot}=4,2$ ккал/моль

Данные о конформации дипептида HPhе-Тур(I_2)ОМе в активном центре пепсина [3070] показывают, что эти два ароматических цикла принимают развернутую конформацию (рис.95).



Различие в полных энергиях этих двух конформаций составляет около 4 ккал/моль, однако эта энергия, по-видимому, компенсируется в комплексе за счет гидрофобных взаимодействий ароматических колец.

В некоторых случаях наблюдается заметное отклонение конформации амидной связи от плоской структуры в участках вторичной специфичности. Так, например, в комплексах эндопепсина с аналогами субстрата, содержащими остаток His в положении P_2 , амидная P_2 - P_1 -связь имеет $\omega=-168^\circ$ [3073]. Такое отклонение на 1-2 ккал/моль менее выгодно по сравнению с плоской структурой.

6.5.2. Состояние расцепляемой связи

Как уже отмечалось, амидная связь в растворе имеет почти плоскую конфигурацию, однако поворот вокруг связи C-N на величины порядка $10-15^\circ$, а также небольшой выход карбонильного атома углерода из плоскости, образуемой атомами C_α , O и N, не сопряжены со значительными энергетическими затратами (см. разд.1.2.1).

Исследования комплекса трипсина с бычьим панкреатическим ингибитором показали [3043,3044], что амидная группа ингибитора Lys15-Ala16 заметно искажена так, что карбонильный атом углерода выходит из плоскости, образованной атомами C_α , O и N (парамидализация). Дальнейший анализ структуры фермент-ингибиторных комплексов сериновых протеаз показал, что эта ситуация не является уникальной (табл. 71) и была довольно подробно проанализирована [3045].

Необходимо отметить, что в свободном бычьем панкреатическом трипсиновом ингибиторе χ_c для связи Lys15-Ala16 близко к нулю [3045].

Предполагалось [3043], что в комплексах с белковыми ингибиторами амидная группа ингибитора (Lys15-Ala16) имеет истинно тетраэдрическое строение, образуя ковалентную связь с гидроксильной группой остатка серина активного центра фермента. Однако дальнейшие исследования, главным образом методами ^{13}C -ЯМР с использованием ангидроферментов, показали [2832,3097,3098], что такая связь не образуется и тетраэдричность карбонила является, по-видимо-

Таблица 71. Внеплоскостная деформация амидной связи в комплексах некоторых амидгидролаз и их зимогенов (обозначения углов см. на стр.10)

Комплекс	Связь	ω_1	χ_c	τ $C'-O\gamma(Ser195)$	Литературный источник
Трипсин - BPTI	Lys15-Ala16	163,9	-12,9	2,7	[3043]
Трипсиноген - SPTI	Lys15-Ile16	172,8	-14,5	-	[3095]
Трипсиноген - - BPTI(Arg ¹⁵) - IleVa	Lys15-Ala16	165,6	-10,4	2,8	[3096]
Трипсиноген - BPTI	"	162,8	-18,5	2,9	[3045]
Ангидротрипсин - BPTI	"	159,5	-10,3	-	[3045]
Субтилизин Карлсберг - - эглин С	Leu45-Asp46	158,0	-10,1	2,81	[3056]
Лейкоцитарная эластаза - OMT-3	Leu18-Glu19	172,0	-5	2,6	[3052]

му, следствием деформации связи в комплексе. Качественные данные о наличии подобной деформации имеются и для других фермент-квазисубстратных комплексов [3049,3054,3057,3087].

Эти данные дают основание полагать, что активные центры, по крайней мере ряда протеаз, "настроены" на деформированную в направлении тетраэдрического состояния амидную группу субстрата. Подтверждением этому могут служить многочисленные данные о связывании кетоаналогов субстратов и пептидальдегидов в виде тетраэдрических гемиацеталей и гемитиоацеталей (кеталей) [3045,3051,3060-3062,3068,3078,3080,3099].

Эта дисторсия, по-видимому сохраняется и в ацилферментах, о чем говорят данные резонансных Раман-спектров хромогенных ацилхимотрипсинов [3100,3101].

Следует отметить, что не во всех комплексах белковых ингибиторов с протеазами наблюдаются отклонения амидной группы "реакционного центра" от планарности [3042,3067]. Более того, в некоторых ацилферментах, например в ацилпапаинах, наблюдается увеличение двоевязанности расщепляемой одинарной C-S-связи [3093,3102].

Хотя степень дисторсии амидной связи в кристаллах комплексов амидгидролаз с субстратоподобными ингибиторами зависит от метода уточнения кристаллографических параметров [3066], сам факт такой дисторсии, по-видимому, не вызывает сомнения. Это обстоятельство может иметь важное значение для понимания эффективности и специфичности амидгидролаз [1715,3103,3104] (подробнее см. гл.8). Дисторсионный механизм катализа, по-видимому, наблюдается также у пептидилпролин *цис-транс*-изомеразы [3105].

6.5.3. Расположение на ферменте и взаимодействия

В этом разделе мы детально рассмотрим, как располагаются субстратоподобные соединения в активных центрах некоторых ферментов, судя по данным рентгеноструктурного анализа.

Сериновые протеазы. Имеются довольно подробные данные о структуре комплексов сериновых протеаз с квазисубстратами, продуктами гидролиза и ингиби-

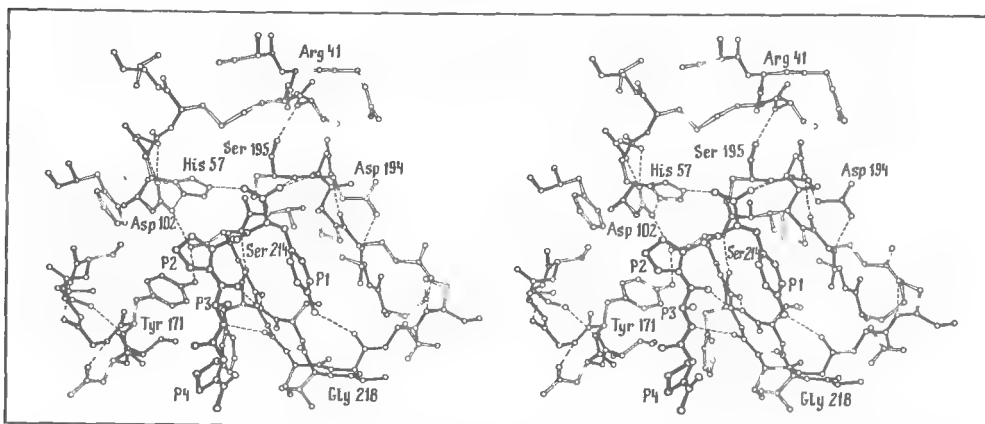


Рис.96. Стереопара расположения AcProAlaProTyrOH в активном центре протеазы А из *Streptomyces griseus* [3063]

торами (см. табл.69). Взаимодействие ароматического кольца субстрата в положении P_1 впервые было описано в работе [1329] на примере комплекса химотрипсина с формил-*L*-триптофаном, а вторичные взаимодействия – на примере комплексов трипсина с панкреатическим трипсиновым ингибитором [3043,3044] и комплексов протеазы А из *Streptomyces griseus* с тетрапептидами типа AcProAlaProTyrOH [3063] (рис.96).

Участок связывания боковой цепи остатка P_1 (S_1 -участок) у химотрипсина ограничен "снизу" цепью остатков 213–220, а "сверху" остатками 190–192. В глубине этого "гидрофобного кармана" расположена боковая цепь остатка Ser189, а снаружи – боковая цепь остатка Met192.

Ароматическая группа квазисубстратов химотрипсина погружена в этот гидрофобный карман так, что ее плоскость параллельна плоскости амидных связей Ser190-Cys191 и Trp215-Gly216. C_β -атом субстрата по данным ЯМР [3106], по-видимому, контактирует с растворителем.

В трипсине остатки Lys или Arg субстрата расположены аналогичным образом, однако существенным отличием трипсиноподобных ферментов от ферментов химотрипсиновой группы является наличие в первых остатка Asp189 (вместо Ser189). Заряженные группы субстрата образуют с карбоксилат-ионом этого остатка солевую связь [1235].

Отличие S_1 -участка субтилизинов от соответствующего участка в химотрипсине заключается в том, что он значительно более открыт и доступен растворителю, так что связывающаяся в этом участке ароматическая группа одной своей стороной экспонирована в растворитель [3060]. То же самое наблюдается в комплексах субтилизинов с макромолекулярными ингибиторами, где боковые цепи гидрофобных остатков (Pro42, Leu45, Leu47 в эглизине С) частично контактируют с растворителем [3056,3107]. Наконец, в случае панкреатической эластазы [3108] в положениях 216 и 226 вместо остатков Gly (у химотрипсина и трипсина) имеются соответственно остатки Val и Thr (Asp в лейкоцитарной эластазе). Наличие этих остатков препятствует связыванию объемистых группировок и играет определяющую роль в специфичности эластазы к боковым цепям

остатка Ala в P_1 .

Расположение ароматической группы в локусе S_1 протеазы А практически идентично расположению триптофанового остатка в химотрипсине [3063].

Остаток тирозина в комплексе протеазы А – продукт (AcProAlaProTyrOH) образует несколько водородных связей (рис.96).

Это, во-первых, водородная связь с карбонильной группой остатка Ser214 ($3,03 \text{ \AA}$). Важность этой связи для катализа постулировалась неоднократно, однако ее не удалось обнаружить в комплексе формилтриптофана с химотрипсином [1329] и в комплексах с трипсином [1231]. Она также не выявляется при расчете конформации субстратов в активном центре фермента методом атом-атомных потенциалов [3024]. Однако эта связь обнаруживается в алкилированных пептидными хлорметилкетонами сериновых протеазах, а также в комплексах этих ферментов с белковыми ингибиторами [3040,3043,3061].

Три водородных связи образует карбоксильная группа остатка тирозина: а) с протонированным $N^{\epsilon 2}$ -атомом His57 ($2,82 \text{ \AA}$); б) с NH пептидной группы остатка Gly193 ($2,81 \text{ \AA}$) и в) слабую связь ($\approx 3,2 \text{ \AA}$) с NH-группой Ser195.

Первая связь имитирует перенос протона на уходящую группу в субстрате, а вторая и третья, характерные для карбонильных групп субстратов и ацилферментов, составляют участок связывания, называемый "оксанионной полостью" [1328,3060].

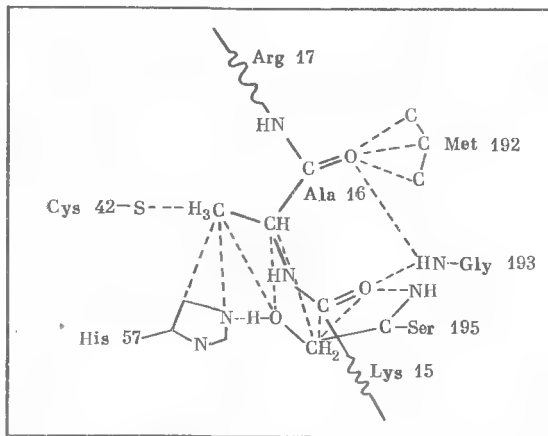
Водородные связи с NH-группами остатков Gly193 и Ser195 наблюдаются практически во всех комплексах сериновых протеиназ с белковыми субстратоподобными ингибиторами [3021,3044,3049,3066,3109]. Как уже отмечалось выше, во многих из этих комплексов амидная группа "реакционного центра" пирамидализована. Это приводит к тому, что расстояние между O^{γ} -атомом Ser195 и карбонильным углеродом потенциально расщепляемой связи снижено по сравнению с суммой Ван-дер-ваальсовых радиусов до $2,6\text{--}2,9 \text{ \AA}$, но больше, чем длина ковалентной связи. Примерно на таком же расстоянии расположен O^{γ} -атом Ser195 от $N^{\epsilon 2}$ -атома His57.

Остатки лиганда $P_2\text{--}P_4$ образуют антипараллельную β -складчатую структуру с цепью фермента 214–218, причем остаток Gly216 своими NH- и CO-группами связывается с группами CO и NH остатка в положении P_3 . Такое взаимодействие наблюдалось с пептидными хлорметилкетонами и белковыми ингибиторами у α - и γ -химотрипсина, эластазы, субтилизина, протеазы В из *Streptomyces griseus* и трипсина [1242,1330,3044,3046,3061,3065]. В трипсине, однако, из-за делеции в положении 218 CO-группа Gly216 ориентирована так, что не может акцептировать водородную связь с субстратом, хотя NH Gly216 сохраняет способность акцептировать H-связь с P_3 -остатком.

Квазисубстрат образует множество гидрофобных контактов в активном центре фермента. В комплексе AcProAlaProTyrOH с протеазой А больше половины (44 контакта) приходится на остаток Tyr в положении P_1 , взаимодействующий с остатками Ala192, Gln192A, Pro192B, Gly215, Gly216 и Thr226. Индолное кольцо в комплексе ForTrpOH с химотрипсином образует 41 контакт с ферментом. Остаток Pro (P_2) образует 12 контактов с остатками His57, Tyr171 и Ser214 и, как уже отмечалось, с карбонильным кислородом Ser214. Остаток Ala (P_3) не взаимодействует с ферментом, за исключением упоминавшихся выше двух во-

дородных связей, а остаток Pro (P_4) дает 12 контактов с остатками Val169, Asn170, Tyr171 и Gly216. Дальнейшее увеличение пептидной цепи субстрата приводит к выходу дополнительных остатков в раствор и не сказывается на скорости его расщепления [3110].

Рис. 97. Взаимодействия аминокислотных остатков бычьего панкреатического ингибитора (показана связь Lys15-Ala16) с группами активного центра химотрипсина [2011]



Положение остатка в уходящей группе субстрата (P'_1) было проанализировано на основании данных о структуре комплексов панкреатического трипсина с трипсином и химотрипсином (рис. 97). Остаток Ala16 в этом ингибиторе взаимодействует своей боковой цепью с атомом серы дисульфидной связи Cys42-Cys58, а также с остатком His57 и O^γ -атомом Ser195. C_α -атом остатка в P'_1 и его карбонильная группа контактируют с боковыми цепями остатков Ser195 и Met192 [2011]. По мнению авторов работы [2011], некоторые из этих контактов вносят отрицательный вклад в общую энергию связывания, но эти неблагоприятные взаимодействия элиминируются в переходном состоянии реакции. Участок связывания P'_2 остатка образован в химотрипсине "ложбиной" между остатками His40 и Gly193. Наиболее важные конформационные изменения, происходящие при связывании субстратоподобных ингибиторов, можно проследить на примере взаимодействия протеазы A из *Streptomyces griseus* с тетрапептидом AcProAlaProTyr-OH [3063]. Они заключаются в следующем: а) C_β - и O^γ -атомы Ser195 перемещаются соответственно на 0,21 и 0,46 Å в сторону от пептида; аналогичное, но более сильное смещение наблюдалось [3111] в комплексе трипсина с трипсиновым панкреатическим ингибитором; б) имидазольное кольцо His57 сдвигается примерно на 0,2 Å (по атому $N^{\delta 2}$) в сторону пептида и в) карбонильная группа Ser214 сдвигается на 0,24 Å в направлении пептида.

Кроме того, на примере комплекса химотрипсина с формилтриптофаном [1329] отмечался поворот боковой цепи остатка Met192 вокруг C_α - C_β -связи примерно на 120° . При этом цепь Met192 переходила из экспонированного в раствор состояния в более глубокие слои глобулы так, что прикрывала боковую цепь субстрата от контакта с водой. Эта роль остатка Met192 подтверждается также кинетическими [3112] и физико-химическими [2292, 3113, 3114] исследованиями.

Как видно, конформационные изменения сериновых протеаз при связывании лигандов незначительны и затрагивают боковые цепи аминокислотных остатков фермента. Исключение составляет, по-видимому, субтилизин BPN', для которого зарегистрировано [3060] перемещение основной цепи в области остатков 125-127 (нумерация субтилизина) примерно на 0,5 Å.

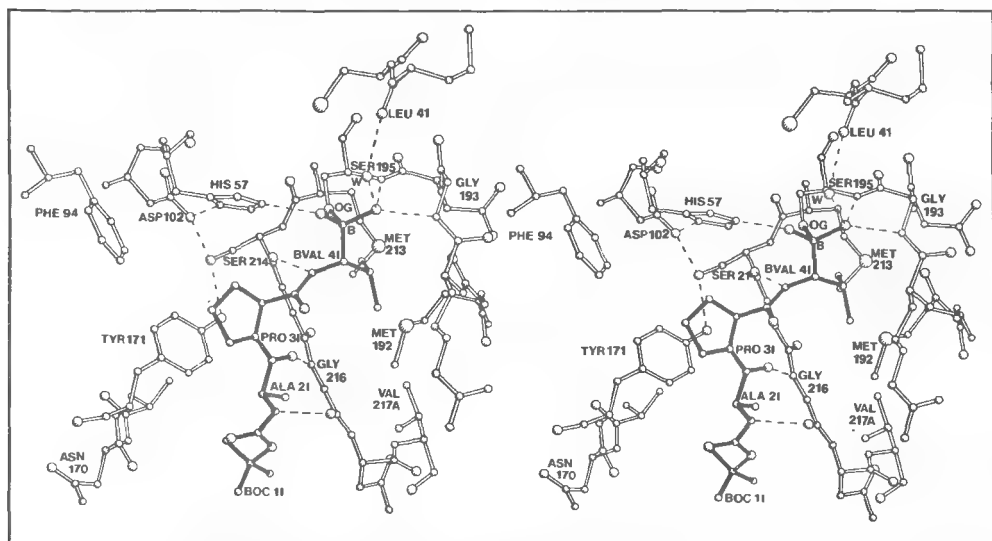


Рис. 98. Стереизображение комплекса $\text{BocAlaProNHCH}(\text{CH}_2\text{CHMe}_2)\text{B}(\text{OH})_2$ (выделено жирной линией) в активном центре α -литической протеазы [2876]

Рентгеноструктурные исследования пептидов, кетоаналогов субстратов и производных борных кислот [2876, 3039, 3051, 3062] позволяют составить представление о положении тетраэдрических промежуточных соединений в активных центрах сериновых протеаз (см. рис. 98).

Исследования комплексов химотрипсина с различными ингибиторами методами ЯМР [3115–3118] в целом подтверждают характер взаимодействий, наблюдающихся для кристаллов фермента. Следует отметить, что кристаллы химотрипсина и протеазы А были получены при $\text{pH} \approx 4$, т.е. в таких условиях, когда ферменты теряют активность. Однако в случае протеазы А кристаллы все же гидролизуют пептидный субстрат [3063], а кристаллы химотрипсина, полученные при более высоких значениях pH [1222, 3119], не имеют существенных отличий от кристаллов "кислой формы".

Причины первичной стереоспецифичности химотрипсина, как показали рентгеноструктурные данные, а также результаты ЯМР-комплексов с *L*- и *D*-трифторацетил-*p*-фторфенилаланином [3116, 3117] и трифторацетилтриптофаном [3015], заключаются в том, что ацильная группа *D*-изомера ориентирована в комплексе в направлении пары Ser195–His57, тогда как правильная ориентация *L*-изомера позволяет этой группе образовывать связь с CO-группой Ser214.

Расчеты методами молекулярной механики показали, что в тетраэдрическом промежуточном соединении *L*-АсТгрон на 9 ккал/моль стабильнее, чем *D*-форма [3015]. Отсюда делается вывод, что стереоспецифичность проявляется в переходном, а не основном состоянии субстрата. Подобные расчеты комплексов BPTI с трипсином [3094, 3120, 3121] подтвердили представление [1235, 3095] о том, что причиной ингибиторных свойств этого и сходных ингибиторов является жесткость фермент-ингибиторного комплекса и экранирование в комплексе остатка гистидина-57 от воды.

Цистеиновые протеазы. Данные рентгеноструктурного анализа комплексов

цистеиновых амидгидролаз с субстратоподобными соединениями сравнительно немногочисленны. Имеются сведения о структуре папаина, ингибированного хлорметилкетонами [3122], комплексов этого фермента с микробными ингибиторами E-64 [3069] и E-64с [2735], а также модель комплекса папаина с цистатином куриного яйца (на основе рентгеноструктурных данных для фермента и ингибитора [2797]). Как уже указывалось, папаин специфичен к пептидам, содержащим ароматическую аминокислоту в положении P_2 . Активный центр этого фермента представляет собой "щель", расположенную между двумя доменами белковой молекулы. Длина "щели" такова, что в ней могут расположиться семь аминокислотных остатков – четыре в подцентрах S_1 – S_4 и три в подцентрах S'_1 – S'_3 .

Анализ структуры папаина, модифицированного по SH-группе остатка Cys25 хлорметилкетонами ZPheAlaCH₂Cl и AcAlaAlaPheAlaCH₂Cl (рис.99), показал, что

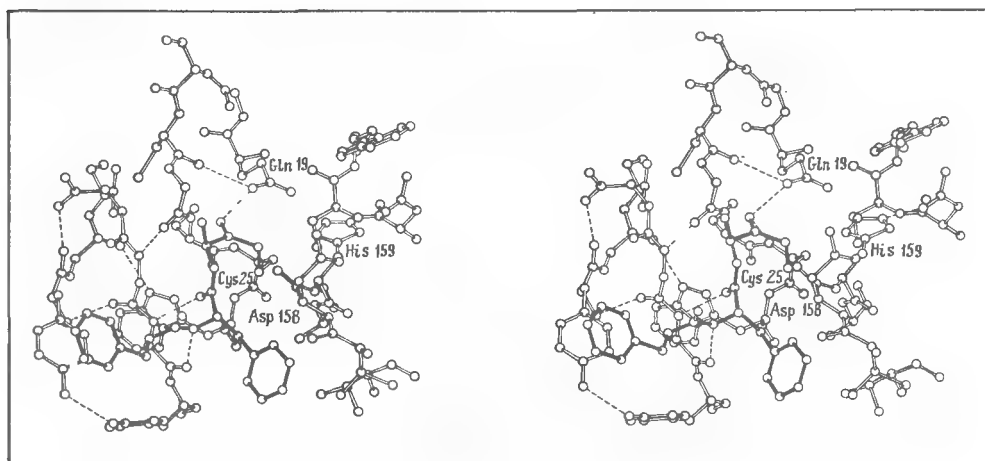


Рис.99. Стереизображение участка активного центра папаина, модифицированного бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланил-*L*-аланилхлоркетонами [3122]

остаток фенилаланина занимает участок S_2 , образованный остатками Trp67, Pro68 и Trp69 одного домена и остатками Phe207, Ala160, Val133 и Val157 другого домена белка. При этом происходит вытеснение молекулы воды. Карбоксильная и NH-группы этого остатка ориентированы в направлении пептидной связи Glu65–Glu66 и могут образовывать с ней водородные связи. C_β -атом остатка Phe образует Ван-дер-ваальсовы контакты с C^δ Pro68 и C_β Ala160, а фенильная группа контактирует в основном с остатками Val133 и Val157.

Аминокислотные остатки в положении P_1 располагаются вблизи основной цепи остатков Glu23 и Ser24 белка. Связывание остатка P_1 также приводит к вытеснению молекулы воды. Карбоксильная группа P_1 направлена в сторону амидной группы боковой цепи Glu19, однако расположение групп $CO(P_1)$, $N^{\epsilon 2}$ Gln19 и NH Cys25 не является оптимальным для образования водородных связей у этих производных фермента.

Имеющиеся данные не позволяют оценить расстояние между карбонильным С-атомом истинного субстрата и атомом серы, а также между $N^{\delta 1}$ -атомом His159 и уходящей группой. В свободном ферменте расстояние $N^{\delta 1}$ His159-S γ Cys25 составляет 3,4 Å [148], что достаточно для образования водородной связи между ними.

Очень сходным образом связываются с папаином эпоксидные ингибиторы E-64 и E-64с [2735,3069]. Эти соединения образуют ковалентные связи с атомом серы Cys25, который атакует С2-атом эпоксидного цикла, причем наблюдается инверсия конфигурации этого атома. Карбоксильная группа ингибитора образует Н-связи с амидной группой Gln19 и NH основной цепи Cys25, а также в случае E-64с $N^{\epsilon 2}$ атомом остатка His159.

Остаток P₃ хлорметилкетонов, а также концевая изопропильная (у E-64с) и концевая гуанидиногруппа (у E-64) связываются вблизи боковой цепи Trp67, и остаток Ala в этом положении находится в контакте с фенольным кольцом Trp61 и C α -атомом Gly65.

Связывание ингибиторов папаином приводит к довольно значительным конформационным изменениям в белке. В случае хлоркетонов атом серы Cys25 сдвигается на 0,9 Å в глубь белковой глобулы, что сопровождается перемещением атомов основной цепи остатков Ser24 и Gly43. При этом боковая цепь Ser176 поворачивается вокруг связи C α -C β на $\approx 120^\circ$ так, что ее гидроксильная группа располагается на расстоянии водородной связи от $O^{\epsilon 1}$ Gln19.

В свободном ферменте протонированная имидазольная группа His159 и ионизированный атом серы Cys25 лежат в одной плоскости, причем $N^{\epsilon 2}$ -атом His159 оказывается далеко от предполагаемого места локализации N-атома уходящей группы истинных субстратов. Однако имидазольное кольцо при связывании субстрата может повернуться на $\approx 30^\circ$ и занять положение, необходимое для передачи протона. Такой поворот не сопровождается разрывом Н-связи $N^{\epsilon 2}$ His159 и CO Asn175.

Связывание ингибиторов приводит и к другим перестройкам основной цепи в области Arg59-Pro68, Ser21-Gly23 и Lys156-His159, доходящим по амплитуде до 1 Å. Эти конформационные изменения открывают доступ субстрата или ингибитора в область активного центра фермента. По данным исследования моделей комплекса папаина с субстратом [3123] уходящая группа субстрата в таком комплексе может неблагоприятным образом взаимодействовать с α -CH₂-группой His159, однако это взаимодействие не реализуется в тетраэдрическом промежуточном соединении. Неблагоприятное взаимодействие тем сильнее, чем больше размер боковой цепи остатка P₂, что может объяснить факт зависимости величины k_{cat} (а не K_m) от гидрофобности этого остатка в субстратах.

Исследование модели, а также данные низкого разрешения (6 Å) для комплексов папаина с квазисубстратами AlaAlaPhe(I-n)Arg и BocPhe(I-n)Arg [3124] позволяют идентифицировать участок связывания уходящей группы в районе остатков Trp177 и Ala136 [1802]. Следует отметить, что область остатка Trp177, по-видимому, соответствует той, где происходит непродуктивное связывание некоторых субстратов типа *n*-нитроанилидов ациламинокислот. Такой вывод был сделан на том основании, что модификация этого остатка увеличивает активность папаина к подобным субстратам [3125].

Построение модели взаимодействия цистатина с папаином [2797] выявило высокую комплементарность области активного центра фермента и "реактивного" центра ингибитора. Этот центр (см. также разд.5) включает остаток Glu9 ингибитора, который в комплексе должен располагаться вблизи Cys25, и консервативный участок 53-57, погружающийся в "щель" между остатками Cys25 и Trp177, причем остатки ингибитора Leu54 и Val55 контактируют с гидрофобными участками Ala136, Ala137 и Gly23 папаина. Участок Pro103-Trp104 ингибитора также взаимодействует с ферментом в области Trp177, причем оба триптофана находятся в стекинг-взаимодействии.

Папаин – пока единственная цистеиновая амидгидролаза, для которой имеются кристаллографические данные о структуре фермент-ингибиторных соединений и комплексов. Анализ кристаллографических данных другой цистеиновой протеазы актинидина в свободном состоянии показывает значительное сходство структуры активного центра со структурой папаина, хотя имеются и некоторые существенные отличия [1264,1265]. Так, атом серы каталитически активного остатка цистеина в актинидине отдален на $2,7 \text{ \AA}$ от плоскости имидазольного цикла и при такой ориентации не может образовывать Н-связь с атомом N^{δ1} последнего. Однако, как и в папаине, имидазольное кольцо может поворачиваться на 35° так, что атом серы оказывается в одной плоскости с имидазольным циклом. Такое положение имидазола стабилизируется тем, что он оказывается в плоскости, параллельной плоскости индольного цикла Trp177. Папаин существует в растворе в двух формах, отличающихся ориентацией имидазольного цикла по отношению к остаткам Asn175 и Asp158 (формы "вверх" и "вниз") [2343]. В то же время фицин, по-видимому, существует только в одной конформации ("вверх"). Вероятно, и актинидин относится в этом отношении к типу фицина, а не папаина.

Различия в каталитических свойствах актинидина и папаина трактовались также [3126] как следствие различий в распределении электростатического поля в активном центре ферментов, однако такая трактовка встретила возражение [3127]. Заметные отличия в свойствах от папаина наблюдаются также для бромелаина. Изучение резонансных Раман-спектров дитиоацилферментов показало [3092], что субстрат в активном центре бромелаина имеет конформацию, отличную от таковой в папаине.

Аспартатные протеазы. Для комплекса свиного пепсина с дипептидом – метиловым эфиром фенилаланилдидтирозина имеются рентгеноструктурные данные лишь при разрешении $3 \text{ \AA}$ [3070,3128]. Однако для очень сходных микробных аспартатных протеаз наряду с результатами относительно низкого разрешения ($2,8\text{--}3,7 \text{ \AA}$) [1281,1345,3129] опубликованы сведения, позволяющие достаточно подробно описать связывание субстрата в активном центре этих ферментов [2612,3071-3073,3076].

Активный центр аспартатных протеаз, как и в случае папаина, расположен в "щели", образуемой двумя доменами белковой молекулы. Каталитически активные группы Asp32 и Asp215 входят в состав разных доменов, но в пространственной структуре сближены на расстояние $\approx 2,6 \text{ \AA}$ (между атомами кислорода). Эти группы находятся в глубине "щели".

Связывание субстратоподобных ингибиторов можно проследить на примере

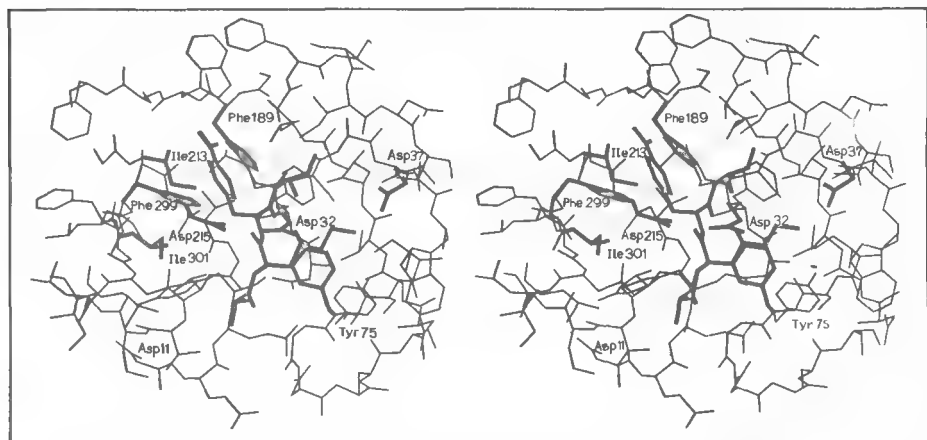


Рис.100. Стереорисунки участка активного центра пенициллопепсина, связанного с тетрапептидом $\text{Ala-Lys-Phe(NO}_2\text{)-Ala}$ (выделено жирной линией) [3129]

комплекса, восстановленного по расщепляемой связи гептапептида — $D\text{-His-Pro-Phe-His-Phe-CH}_2\text{-NH-Phe-Val-Tyr-OH}$ с ризопуспепсином [3076], а также близкого по структуре пептида (H256) — $\text{Pro-Thr-Glu-Phe-CH}_2\text{-NH-Phe-Arg-Glu-OH}$ с эндотиапепсином [2612]. Эти ингибиторы встраиваются в активный центр в вытянутой конформации (рис.100) так, что атом углерода, имитирующий карбонильную группу субстрата располагается вблизи каталитически активных остатков Asp32 и Asp215 (нумерация пепсина). Группа NH остатка Phe в положении P_1' находится на расстоянии 2,83 Å от $O^{\delta 2}$ -атома Asp215 [3076]. Ориентация карбоксильной группы расщепляемой связи может быть выведена из анализа структуры комплексов аспартатных протеаз с пепстатином и его аналогами [3071, 3072, 3075], пептидами типа $R\text{-CH(OH)CH}_2\text{COR}'$ (где R и R' — остатки аминокислот) [3073,

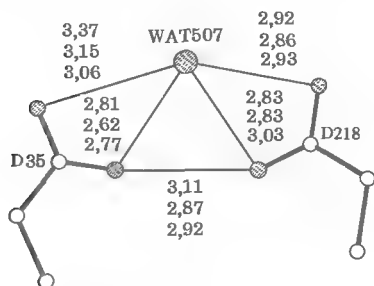


Рис.101. Расстояния между атомами кислорода карбоксильных групп активных центров аспартатных протеаз (нумерация ризопуспепсина) и молекулой воды

Цифры (сверху вниз) для эндотиапепсина, пенициллопепсина и ризопуспепсина [3076]

31301 и из модельных построений [2334, 3131]. В свободных ферментах группы Asp32 и Asp215 образуют удивительно симметричную структуру (рис.101). Карбонильная группа субстрата располагается, по-видимому, так, что молекула воды, связанная с четырьмя атомами кислорода Asp32 и Asp215, вытесняется карбонильным атомом кислорода субстрата [3131]. Боковая цепь остатка P_1

взаимодействует с группой гидрофобных остатков в ферменте - Ile30, Tyr75, Phe111 и Ile120. Группа NH этого остатка образует H-связь с карбонильной группой Gly217. Как уже отмечалось в гл.4, аспаратные протеазы можно разделить на две группы по специфичности к P₁-остатку - группу пепсина, куда входят пепсины из разных источников, химозин, ренин и др., специфичные к ароматическим и объемным гидрофобным остаткам в этом положении, и группу пенициллопепсина (эндотиапепсин, ризопуспепсин и др.), обладающую выраженной лизиновой специфичностью [2334].

Важное отличие этих двух групп ферментов - остаток Asp114, характерный для всех изученных ферментов, способных гидролизовать субстраты, содержащие в P₁ остаток лизина. ε-NH₂-группа лизина таких субстратов располагается вблизи остатка Asp114 и взаимодействует с ним, давая, по-видимому, H-связь через мостиковую молекулу воды [2334]. Следует отметить, что пепсин также имеет катионсвязывающий центр, расположенный в области вторичных фермент-субстратных взаимодействий как в S-, так и в S'-областях [3005].

Модельные построения и данные рентгеноструктурного анализа дают зоны вторичных взаимодействий для "идеального" (по данным индексов специфичности, см. разд.4.3.2.1) субстрата пепсина, приведенные в табл.72 [1270].

Таблица 72. Остатки пепсина, контактирующие с боковыми цепями "идеального" субстрата HAsnIleGluPheTyrValLeuOH

Субстрат		Остатки пепсина	
P ₄	Asn	S ₄	Thr12, Ser219, Leu220, (Glu244, Met245)
P ₃	Ile	S ₃	Glu13, Ile30, Phe111, Phe117, Ser219
P ₂	Glu	S ₂	Thr218, Thr222, Glu287, Met289, Gly76, Thr77
P ₁	Phe	S ₁	Ile30, Asp32, Tyr75, Thr77, Phe111, Leu112, Phe117, Ile120, Gly217
P' ₁	Tyr	S' ₁	Tyr189, (Gln191), Ile213, Val291, Thr293, Leu298, Ile300
P' ₂	Val	S' ₂	Gly34, Ser35, Asn37, Ile73, Tyr75, Ala130
P' ₃	Leu	S' ₃	Ile128, Gly188, Tyr189

Группы NH и CO субстрата в положениях P₂, P'₁, и P'₂ образуют водородные связи с соответствующими партнерами основной цепи фермента и карбоксильными группами остатков аспаргиновой кислоты. N-концевой фрагмент пептидного субстрата, по-видимому, более подвижен в комплексе, чем C-концевой фрагмент, о чем свидетельствуют ЭПР-спектры соответственно меченных спин-метками аналогов пепстатина [3132]. Что касается конформационных перестроек самих ферментов при связывании субстратоподобных ингибиторов, то этот процесс не сопровождается значительными изменениями в области активных центров. Однако, как это было отмечено, для пепсина [1270] и для эндотиапепсина [3073] происходит хотя и небольшое, но важное изменение взаимного расположения двух доменов - N- и C-концевых. C-концевой домен (остатки 193-298) поворачивается целиком (как "твердое тело") на ~4° и смещается на 0,3 Å вдоль оси, проходящей через C_α-атомы остатков Asp32 и Asp215. Это приводит к заметному изменению конфигурации всей "щели" активного центра - расстояние

между некоторыми остатками изменяется на величину до $2 \text{ \AA}$. Предполагается [3073], что эти изменения важны для механизма действия (см. гл.7). Боковые цепи некоторых остатков смещаются на расстояние до $2,5-3,5 \text{ \AA}$.

На основе вышеприведенных экспериментальных данных была построена модель комплексов аспартатных протеаз с субстратом в переходном состоянии (или,

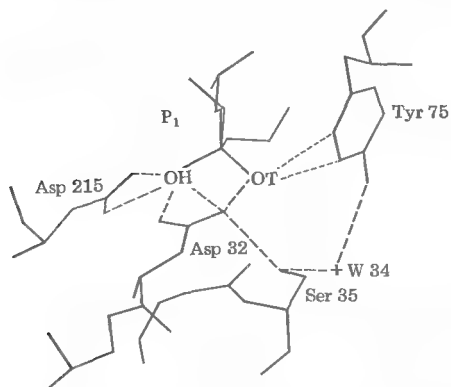


Рис.102. Структура тетраэдрического промежуточного соединения в активном центре аспартатных протеаз. OH и OT — атомы кислорода расщепляемой группы субстрата. Пунктирные линии — водородные связи. Показано взаимодействие одного из атомов кислорода (OT) с ароматическим циклом Tyr75 [3130].

скорее, в виде тетраэдрического промежуточного соединения) [3130] (рис. 102). Обращает на себя внимание постулированное в этом комплексе взаимодействие одного из атомов кислорода тетраэдра с ароматическим циклом остатка Tyr75, которое может давать вклад в энергию связывания до 5 ккал/моль [3133].

Металлозависимые протеазы. Известна структура комплексов карбоксипептидазы А с рядом субстратоподобных ингибиторов и структура фермент-ингибиторных комплексов термолизина (см. табл.69). Наиболее подробно был изучен комплекс карбоксипептидазы А с GluTyr. Предполагалось, что связывание этого дипептида ферментом отражает продуктивное связывание истинного субстрата, однако дальнейшие исследования [3079] показали, что субстрат вытесняет воду из координационной сферы иона Zn^{2+} , т.е. связывается непродуктивно. Вместе с тем исследование этого комплекса дало очень много для понимания структуры и механизма действия карбоксипептидазы А.

Глицилтирозин связывается ферментом вблизи атома цинка так, что ароматическая боковая цепь лиганда помещается в "гидрофобный карман", образованный боковыми цепями остатков Ile243, Ile247, Tyr248, Gly253, Ile255, Thr268. Боковая цепь остатка Tyr248 располагается в плоскости почти перпендикулярной плоскости тирозинового кольца субстрата (рис.103).

Карбоксилат-ион субстрата образует солевую связь с гуанидиногруппой остатка Arg145, а карбонильная группа амидной связи координирует с ионом Zn^{2+} . В истинных субстратах эта группа, по-видимому, направлена в сторону гуанидиногруппы остатка Arg127 [3081]. Заряженная аминогруппа при высоких значениях pH (в непротонированной форме) дает координационную связь с ионом Zn^{2+} [3134], что приводит к вытеснению воды.

Эти взаимодействия сопровождаются значительными конформационными перестройками в активном центре фермента: а) гуанидиновая группа Arg145 перемещается на $2 \text{ \AA}$ в направлении к лиганду за счет поворота вокруг связи C_β -

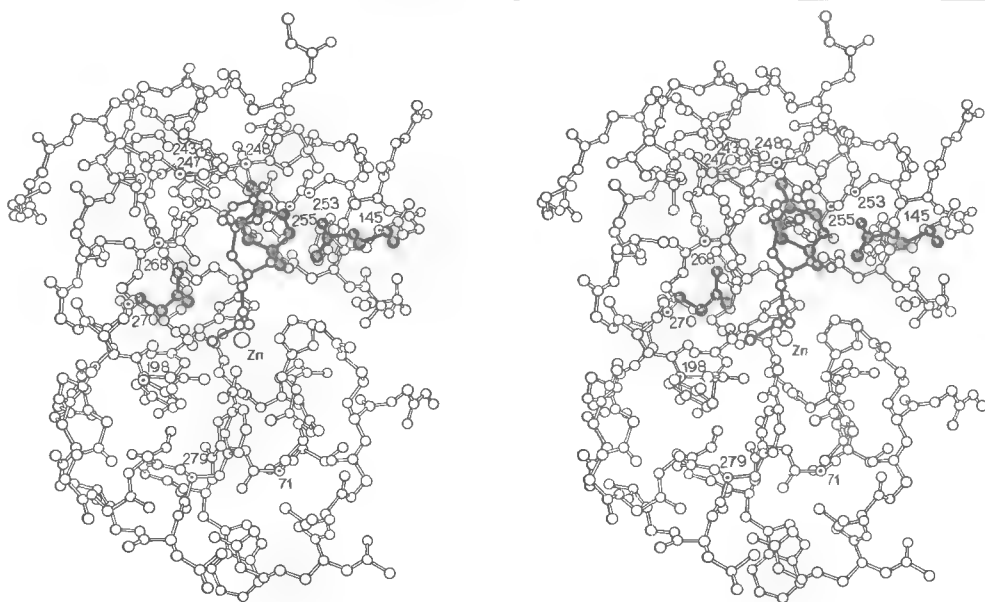


Рис.103. Стереизображение псевдосубстрата глицилтирозина в активном центре карбоксипептидазы А [149]

C_γ ; σ) карбоксильная группа Glu270 также смещается на $2 \text{ \AA}$ и занимает положение, в котором один из атомов кислорода отстоит на $3,6 \text{ \AA}$ от карбонильного углерода субстрата; б) наиболее значительным является изменение ориентации боковой цепи Tyr248. Фенольный гидроксил этого остатка перемещается на $12 \text{ \AA}$ за счет вращения вокруг $C_\alpha-C_\beta$ -связи и небольшого ($1-2 \text{ \AA}$) смещения полипептидной цепи. В новом положении фенольный гидроксил Tyr248 отстоит на $3 \text{ \AA}$ от NH-группы расщепляемой связи. Перемещение Tyr248 становится возможным в результате смещения Arg145 при образовании этим остатком солевой связи с карбоксилат-ионом субстрата.

Квантово-химические расчеты [3135] показывают, что энергетически более выгодным является механизм "скольжения" субстрата в направлении Arg145, так что карбоксилат-ион попеременно образует солевые связи с остатками Arg71, Arg127 и, наконец, Arg145.

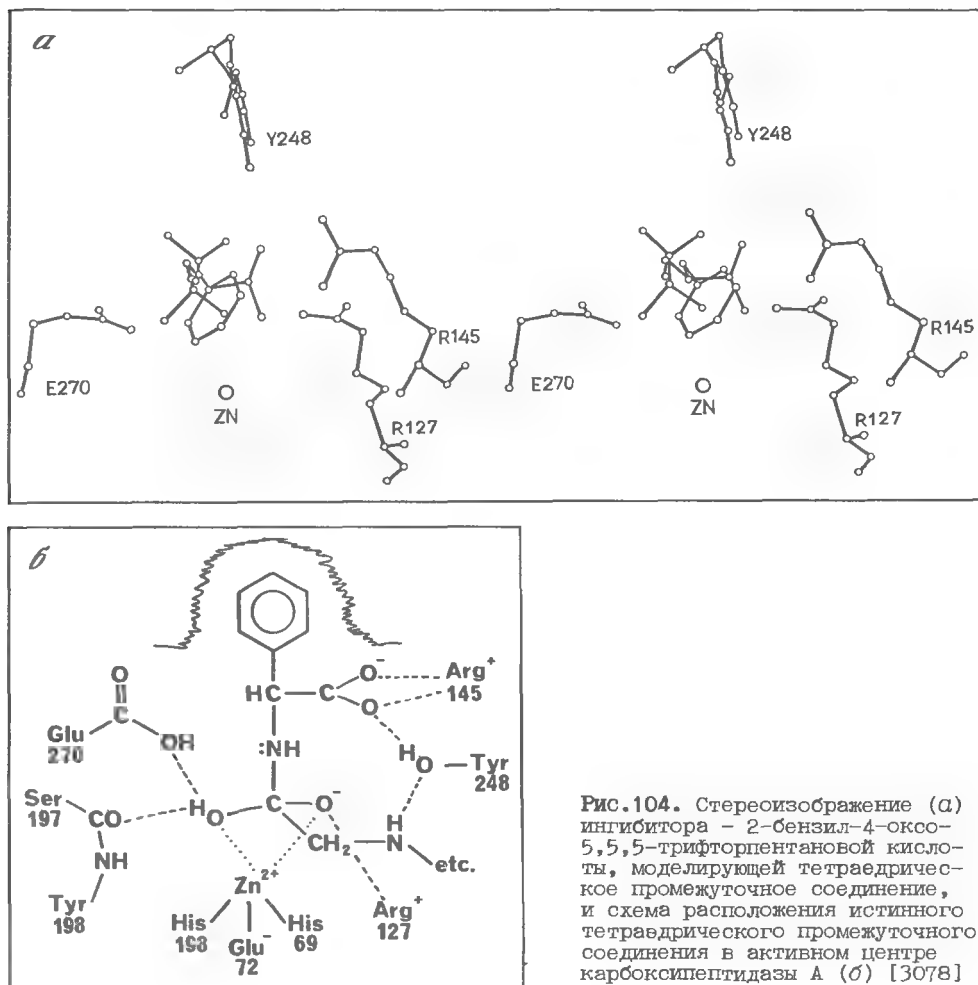
На основании анализа моделей было сделано заключение, что при связывании субстрата в активном центре карбоксипептидазы А возможно существенное искажение плоской структуры амидной связи. Этому обстоятельству придается большое значение при формулировании механизма действия фермента [3136, 3137].

Моделирование структуры комплекса карбоксипептидазы А с пептидом ZAlaAlaTyr [3138], а также анализ структуры комплекса фермента с белковым ингибитором из картофеля [3082] позволили идентифицировать вторичные участки связывания в области остатков Arg71, Tyr248 и Phe279.

Изложенные выше результаты вызвали острую дискуссию (см.: [1964, гл.1;

3139]), особенно в отношении данных по перемещению остатка Tyr248. Было показано [1370, 3140], что в карбоксипептидазе А, модифицированной арсаниловой кислотой по Tyr248, связывание субстрата (в растворе) приводит к переходу метки во внешние слои белковой молекулы, доступные растворителю. Отсюда ставилась под сомнение роль этого остатка в катализе. В конечном счете выяснилось, что этот остаток можно методом направленного мутагенеза (см. разд. 4.6.2.) заменить на остаток фенилаланина без заметного изменения активности. По-видимому, спектральные изменения, наблюдавшиеся для арсанил-производных фермента, обусловлены особенностями его кристаллической упаковки [1371, 3035]. Вместе с тем Tyr248 все же участвует в стабилизации комплекса, образуя водородные связи с карбоксильной группой С-концевого остатка субстрата и NH-группой остатка P₁.

Обширная дискуссия происходила в отношении числа связывающих субстрат центров у карбоксипептидазы А. Это было вызвано различными спектральными свойствами комплексов фермента с эфирами и амидами [3141]. Однако большин-



ство исследователей разделяют представление о том, что различия в поведении эфиров и амидов обусловлены тем, что карбонил этих субстратов связан соответственно или с ионом Zn^{2+} или с гуанидиногруппой остатка Arg127. Важное значение может иметь также различие в скорость лимитирующей стадии процесса гидролиза [3077,3142].

Исследование кетоаналогов субстратов [3078,3080], а также фосфоамидатов [2628,3081] в комплексах с карбоксипептидазой позволили составить представление о структуре промежуточных тетраэдрических соединений в ходе катализа. Оба атома кислорода тетраэдра входят в координационную сферу иона Zn^{2+} , а также связываются с остатками Glu270 и Arg127. Схема структуры тетраэдрического промежуточного соединения показана на рис.104.

Несмотря на существенные различия в структуре карбоксипептидазы А и термолизина, ориентация субстратоподобных ингибиторов в активных центрах этих двух ферментов имеет много общего. Изучение структуры комплексов термолизина с β -фенилпропионил-*L*-фенилаланином, бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланином, *L*-бензилянтарной кислотой, фосфоамидоном и другими лигандами [2628,2728,2891,3083-3087] позволило следующим образом представить строение продуктивного комплекса этого фермента с субстратом (рис.105). Ароматическая боковая цепь остатка P_1' субстрата связывается в гидрофобном кармане фермента, образованном остатками Val139, Leu133, Phe130, Leu202, Glu189, Val192 и Ile188. Карбоксильная группа P_1' -остатка образует водородную связь с гуанидиногруппой Arg203, а NH- и CO-группы остатка P_2' субстрата - водородные связи с амидной группой боковой цепи остатка Asp112. Остаток P_2 связывается с основной цепью остатка Trp115, образуя с ним участок β -структуры. Расщепляемая связь субстрата локализуется вблизи иона Zn^{2+} и его карбонильная группа занимает положение четвертого лиганда атома металла. Карбоксильная группа Glu143 оказывается на расстоянии около 4 Å от карбонильного атома углерода, причем рядом с карбоксилем расположена молекула воды. Наконец, $N^{\epsilon 2}$ -атом остатка His231 оказывается вблизи NH-группы P_1' -остатка субстрата. Конформационные изменения, детектируемые при связывании фосфоамидона, ограничиваются несколькими десятками долями Å и затрагивают боковые цепи остатков Asn112,

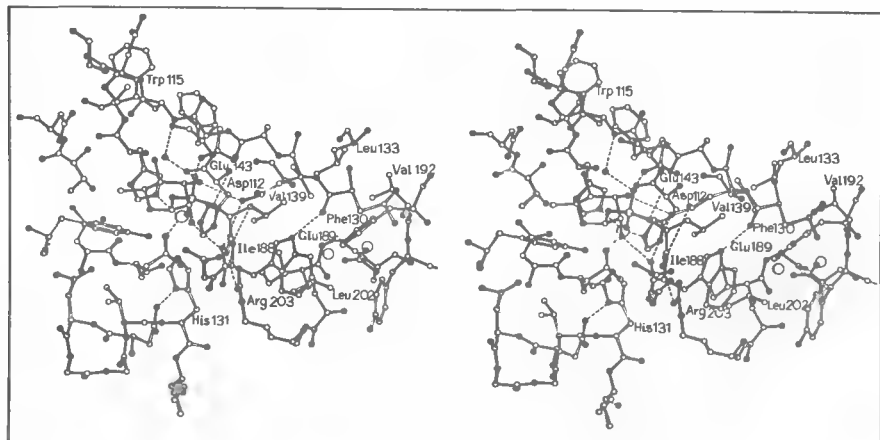


Рис.105. Связывание субстрата в активном центре термолизина [3085]

Leu202 и Glu143.

Непосредственное окружение иона Zn^{2+} в термоллизине и карбоксипептидазе А очень сходно [1348,2628]. Более того, такое же окружение наблюдается у некоторых дегидрогеназ.

Важным обстоятельством является то, что в ближайшее окружение атома металла входят как карбонильная группа субстрата, так и молекула воды, т.е. цинк находится, по-видимому, в пентакоординационном состоянии.

6.6. Оценка полной энергии фермент-субстратного взаимодействия

Интересно оценить полную энергию взаимодействий субстрата и фермента и сравнить ее с наблюдаемыми величинами. Дать такую оценку можно лишь весьма приблизительно. Из данных по структуре комплекса AcProAlaProTyrOH в активном центре протеазы А из *Streptomyces griseus* известно [3063], что этот тетрапептид образует с ферментом 78 Ван-дер-ваальсовых контактов с $r < 4 \text{ \AA}$ и 7 водородных связей. Принимая среднюю величину энергии Ван-дер-ваальсова контакта в $-0,05 \text{ ккал/моль}$ и энергию водородной связи порядка -3 ккал/моль (см. табл.66), получаем полную энергию взаимодействия порядка -25 ккал/моль . Оценки энергии взаимодействия P_1 -остатка в карбоксипептидазе А [3143] дали значение -15 ккал/моль . Полная энергия невалентных взаимодействий в ацил-ферменте – индолилалкрилоилхимотрипсине [3024] составляет около -30 ккал на моль . Электростатическое взаимодействие карбоксилат-иона и гуанидиногруппы в карбоксипептидазе дает вклад около -11 ккал/моль [3135]. Наконец, Ван-дер-ваальсовы взаимодействия в подцентре D активного центра лизоцима с гликопираниозидным циклом составляют -14 ккал/моль [2939].

Для всех перечисленных соединений константы равновесия комплексообразования составляют около $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, что соответствует изменению свободной энергии $4,2 - 5,5 \text{ ккал/моль}$. Величина энтальпии комплексообразования, например ацетилтриптофана с химотрипсином, составляет -9 ккал/моль [2469]. Таким образом, наблюдаемая энергия комплексообразования, по-видимому, намного ниже, чем та энергия, которая получается расчетным путем при суммировании всех взаимодействий белка и лиганда.

Очевидно, что при расчетах не принимаются во внимание затраты энергии на конформационные изменения белка и субстрата и многие другие факторы, трудно поддающиеся учету. Эти затраты, по-видимому, важны для катализа.

6.7. Заключение

Изложенные выше сведения позволяют отметить следующие важные характеристики фермент-субстратных взаимодействий: а) связывание фермента с субстратом во многих случаях происходит ступенчато, причем за быстрой диффузионно-контролируемой стадией ассоциации следует более медленная стадия "подстройки" реагирующих веществ; б) в продуктивном фермент-субстратном комплексе возможно искажение структуры планарной амидной связи, претерпевающей гидролиз, так что она становится неплоской ("пирамидализация"); в) образование комплекса,

как правило, сопровождается конформационными перестройками белка; эти перестройки обычно носят локальный характер; 2) фермент-субстратный комплекс стабилизируется многими нековалентными связями; общая энергия этих связей превышает величину свободной энергии, измеряемую на основании величин констант ассоциации фермента и субстрата..

ХИМИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СУБСТРАТА

Образование продуктивного фермент-субстратного комплекса создает возможность для реализации следующего этапа каталитического акта – химического превращения субстрата в продукты реакции. Эффективность такого превращения будет определяться состоянием каталитических групп фермента в комплексе, их расположением относительно гидролизуемой связи и состоянием самой расщепляемой связи субстрата. Отдельные вопросы, касающиеся механизмов этой стадии каталитического акта, освещены в обзорах [9,1405,1406,1613,3144–3149].

7.1. Состояние каталитически активных групп

Эффективный гидролиз амидов и других производных карбоновых кислот требует наличия в системе трех компонентов: нуклеофила, непосредственно атакующего карбонильный углерод гидролизуемого соединения; общего (или специфического) основного катализатора, способствующего отщеплению протона от молекулы воды или другого нуклеофила, и общего кислотного катализатора, стабилизирующего промежуточные структуры и способствующего отщеплению уходящей группы. Очевидно, что роль нуклеофила и общего основного катализатора могут играть группы, несущие отрицательный заряд или имеющие избыточную электронную плотность, тогда как в роли общих кислотных катализаторов могут выступать группы электрофильного характера, несущие легкодиссоциирующий протон.

Участвующие в катализе группы у представителей всех типов амидгидролаз в настоящее время довольно однозначно идентифицированы (см. разд.2.6). Однако их состояние и конкретная роль в катализе во многих случаях остаются предметом дискуссий.

У сериновых протеаз важнейшими каталитически активными группами являются гидроксильная группа остатка Ser195 (по нумерации химотрипсина), имидазольная группа остатка His57 и карбоксильная группа остатка Asp102. Кроме того, существенную роль в катализе играют амидные группы основной цепи белка – NH-группа Ser195 и NH-группа Gly193.

У цистеиновых ферментов эквивалентами первых двух групп служат SH-группа остатка Cys25 (нумерация папаина) и имидазольная группа His159. Группа, аналогичная Asp102 у цистеиновых протеаз, по-видимому, отсутствует, однако возможно участие в катализе карбоксильной группы остатка Asp158 [3150]. Аналогами двух других групп являются группа боковой цепи Gln19 и NH-группа основной цепи Cys25.

Аспартатные протеазы содержат две каталитически активные группы Asp32 и Asp115 (нумерация пепсина).

Металлзависимые экзопептидазы (карбоксипептидазы) содержат в активном центре ион Zn^{2+} , и, кроме того, в катализе участвуют группы Glu270 и Arg127 (нумерация карбоксипептидазы А быка). У эндопептидаз этого типа наряду с Zn^{2+} имеется карбоксил остатка Glu143 и вместо аргининового остатка – остаток His231 (нумерация термолизина).

Кроме этих групп в активных центрах многих амидгидролаз методами кристаллографического анализа высокого разрешения обнаруживают связанные молекулы воды.

Таким образом, в качестве каталитически активных групп выступают остатки, весьма сильно отличающиеся по значениям pK_a и, следовательно, по способности к ионизации в области pH, оптимальной для действия фермента.

Состояние ионизации каталитически активных групп зависит от конкретного их окружения в молекуле белка. Результаты исследования pH-зависимости катализа (см. разд.5.2), химической модификации [2344,2359,3151-3156], физико-химических исследований [2345,2347,2349,2350,2355,3157-3162] и теоретических расчетов [3163-3165] позволили достаточно надежно определить значение pK_a каталитически активных групп во многих амидгидролазах (табл.73).

Данные табл.73 нуждаются в некоторых комментариях. Основность серинового гидроксила в ферментах группы химотрипсина, трипсина и др. определить не

Таблица 73. Значение pK_a и состояние ионизации каталитически активных групп некоторых амидгидролаз

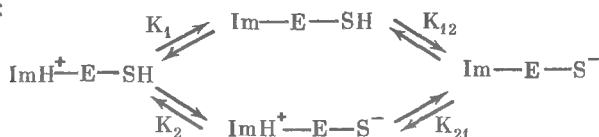
Группа	Фермент	pK_a	$pH_{опт}$	Доля заряженной формы в $pH_{опт}$	Литературный источник
$-CH_2OH$	Химотрипсин и др.	$\approx 13,5$	8,0	$3,2 \cdot 10^{-6}$	[1527]
$-CH_2SH$	Папаин	4,1*	6,0	0,99	[2345]
	Химопапаин А	6,8	7,2	0,71	[3153]
	Химотрипсин	6,8	8,0	0,06	[3160]
	Трипсин свиный	5,0	8,0	$1 \cdot 10^{-3}$	[3160]
	α -Литическая протеаза	5,7	8,0	$5 \cdot 10^{-3}$	[3160]
	Папаин	4,26*	6,0	$2 \cdot 10^{-2}$	[3169]
	Термолизин	7,8	8,0	0,39	[1527,2329]
$-COOH$	α -Литическая протеаза (Asp102)	4,5	8,0	1	[2350]
	Папаин (Asp158)	4,2	6,0	0,98	[3150]
	Пепсин (Asp32)	1,5	2,5	0,91	[2324,3170]
	" (Asp215)	4,7	2,5	$6,3 \cdot 10^{-3}$	[2324,3170]
	Карбоксипептидаза А (Glu270)	6,0	8,0	0,99	[3171]
	Термолизин (Glu166)	6,2	8,0	0,98	[1527]
$Zn^{2+} \dots OH_2$	Карбоксипептидаза А	≈ 7	8,0	0,9	[1566]
	Термолизин	≈ 7	8,0	0,9	[1566]
CONH	Все ферменты	$\approx 18^{**}$	-	-	[71]

* Значения pK_a каталитических групп папаина сильно зависят от pH и состояния SH-группы.

** Для ионизации $CONH \rightleftharpoons CON^- + H^+$.

удается, поскольку титровать белки до значений $\text{pH} \approx 14$ невозможно. Указанное в таблице значение pK_a приписывается этому остатку на основании значений pK_a гидроксильной группы в N-ацетилсериамиде. Одно время полагали [3166], что значение pK_a серинового гидроксила может быть значительно меньше (≈ 8) за счет соседства с положительно заряженными группами, например аргинина. Однако кристаллографические данные не подтвердили это предположение.

Довольно сложным является состояние ионизации остатков Cys25 и His159 в папаине и некоторых других родственных цистеиновых ферментах. Значение pK_a каждой из этих групп зависит от состояния ионизации другой группы. Предполагается, что в папаине существует следующая система прототропных равновесий:



с pK_1 4,26; pK_2 3,34; pK_{12} 7,55 и pK_{21} 8,47. Это, по-видимому, обусловлено существованием двух pH-зависимых конформационных состояний фермента (см. разд.5.2.3.) и, вероятно, является следствием влияния электростатического поля, создаваемого группой с pK_a 5-6, удаленной от каталитического центра [3167]. У папаина ионизация этой группы практически не сказывается на активности, но у катепсинов В и Н и у актинидина это влияние достаточно велико. В актинидине предполагается [3167], что такой группой является карбоксильная группа остатка Glu52.

Экспериментально определяемые константы ионизации связаны с приведенными здесь микроскопическими константами соотношениями [3168]:

$$K'_1 = K_1 + K_2 \quad \text{и} \quad K'_2 = \frac{K_{12} K_{21}}{K_{12} + K_{21}}.$$

Для многих групп в ферментах значения pK_a приписаны лишь на основе данных по pH-зависимости кинетических констант гидролитических реакций. О сложности таких отнесений уже говорилось с разд.5.2.2.

Значения pK_a карбоксильным группам Asp32 и Asp215 (соответственно 1,5 и 4,7) были приписаны на основании pH-зависимости их химической модификации эпоксидами и диазосоединениями [1343,2693], а также pH-зависимости пепсинового катализа. Реакции химической модификации - довольно сложные процессы, и нет полной уверенности в том, что эти данные однозначно характеризуют состояние ионизации исследуемых групп. Более того, учитывая удивительную симметрию расположения и взаимодействий карбоксильных групп активных центров этих ферментов (см. разд.6.5.3) можно предположить близость их pK_a , а ионная асимметрия может возникать лишь в комплексе с субстратом. Хотя квантово-химический анализ [3165] в целом согласуется с этими представлениями, не исключено, что приписывание значений pK_a этим группам будет пересмотрено.

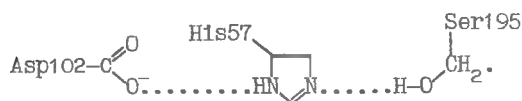
Данные табл.73 показывают, что потенциальные нуклеофильные группы многих ферментов или находятся в оптимуме pH действия данного фермента в очень низкой концентрации заряженной формы, как, например, сериновый гидроксил,

или же, если и полностью ионизированы, то относятся к числу весьма слабых оснований, обладающих низкой нуклеофильностью (например, COO^- -группа в аспартатных протеазах).

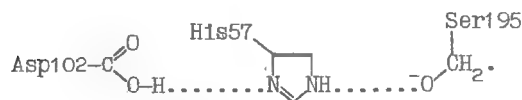
Очевидно, должны существовать механизмы, повышающие нуклеофильность (или концентрацию) данной группы или же увеличивающие реакционную способность субстрата по отношению к слабому нуклеофилу.

7.2. Системы переноса заряда

В 1969 г. была предложена [1327] весьма плодотворная идея, объясняющая аномально высокую реакционную способность серинового гидроксила в химотрипсине. Кристаллографические данные, а также более тщательное исследование первичной структуры фермента показали, что три функциональных группы – Asp102 (которая раньше считалась остатком Asn), His57 и Ser195 – сближены в пространственной структуре фермента и образуют единую систему, связанную водородными связями:



Поскольку карбоксильная группа Asp102 находится в гидрофобном окружении и экранирована от растворителя, было высказано предположение, что ее pK_a является аномально высоким, и поэтому система связей может изомеризоваться:



Аналогичная система была постулирована [1231,1240,3063,3172] для многих других сериновых протеаз. В такой системе заряд с карбоксильной группы может быть перенесен в нейтральной среде на сериновый гидроксил, и последний приобретает весьма высокую нуклеофильность.

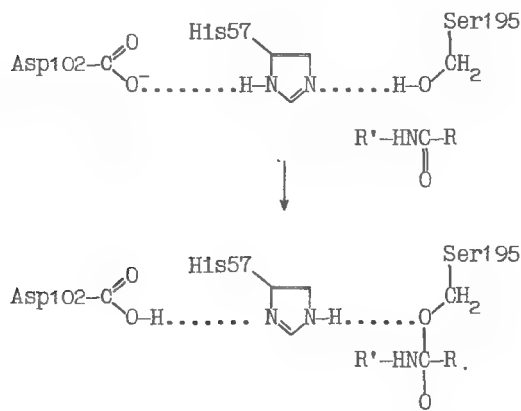
В качестве аргумента в пользу наличия такой системы в сериновых протеазах рассматривались [3145] данные о том, что ее разрушение путем метилирования $\text{N}^{\epsilon 2}$ -атома His57 в химотрипсине снижает каталитическую активность более чем на пять порядков [1325]. Надо, однако, отметить, что, несмотря на очень небольшие изменения в активном центре, His57-метилхимотрипсин по многим параметрам отличается от нативного фермента [3173], в том числе, например, по устойчивости к денатурации [3174]. Таким образом, причина низкой каталитической активности этого производного может быть не связана с разрушением "системы переноса заряда". Более того, в неактивных химотрипсиногене и щелочной форме химотрипсина положение групп, образующих эту систему, такое же, как в нативном ферменте [2290].

Необходимыми условиями переноса заряда должны быть близость значений pK_a имидазола и Asp102 и расположение всех атомов, участвующих в образовании системы, оптимальным образом для возникновения прочных водородных связей.

Предпринималось много попыток определить истинные значения pK_a групп, входящих в систему переноса заряда с использованием разностного титрования

в условиях денатурации фермента [3175], ИК- [2355] и ЯМР-титрования [2349, 2350, 3157, 3158, 3176]. Исследования дали противоречивые результаты. Утверждалось [2355, 3176], что эти данные согласуются с наличием системы переноса заряда и что группа фермента, ионизирующаяся при $\text{pH} \approx 7$, принадлежит остатку Asp102, а His57 не протонируется вплоть до $\text{pH} 2$.

Это привело к формулированию другой схемы, включающей "систему переноса заряда", функционирующую в процессе катализа [3176]:



Эта схема предусматривает согласованный перенос двух протонов на скорость лимитирующей стадии, что не противоречило данным [3177] по "инвентаризации протонов" (измерение зависимости кинетического изотопного эффекта растворителя в смесях $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ разного состава; см. разд.3.3.3), указывающих на "мультипротонный" катализ [3178]. Однако этот катализ наблюдался и для ($\text{N}^{\epsilon 2}$ -метилгистидин)-химотрипсина, у которого система переноса заряда отсутствует [3179].

В дальнейшем [2350, 3180, 3181] на примере α -литической протеазы (содержащей только один гистидин) было показано, что pK_a His57 около 7. С этим согласуются результаты [2349, 3157] исследования низкопольных сигналов ЯМР химотрипсина и других сериновых протеаз, а также результаты [3158] C2-протонного резонанса имидазола в трипсине. Анализ структуры протеазы A из *Streptomyces griseus* показал [3063], что карбоксильная группа Asp102 связана максимально возможным числом Н-связей (4 связи) и поэтому не может иметь высокого значения pK_a .

Кристаллографические данные подвергались неоднократному пересмотру. Ревизия исходных данных [1327] показала [1249], что в нативном α -химотрипсине, а также в γ -химотрипсине, трипсине, субтилизине BPN' и эластазе сериновый гидроксил не лежит в плоскости имидазольного кольца и O γ -атом Ser195 отстоит от $\text{N}^{\epsilon 2}$ -атома His57 на 3,5–3,7 Å и отклоняется на 2,5–3,5 Å от расположения, необходимого для образования водородной связи (рис.106). Хотя в сериновых протеазах остаток Ser195 может достаточно свободно вращаться вокруг $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta$ -связи примерно на 120° (см. разд.6.5.3), ни в одном из его положений он не приближается к $\text{N}^{\epsilon 2}$ -атому His57 настолько, чтобы образовать хорошую водородную связь [1229].

Более поздние результаты показали, однако, что в химотрипсине [1226],

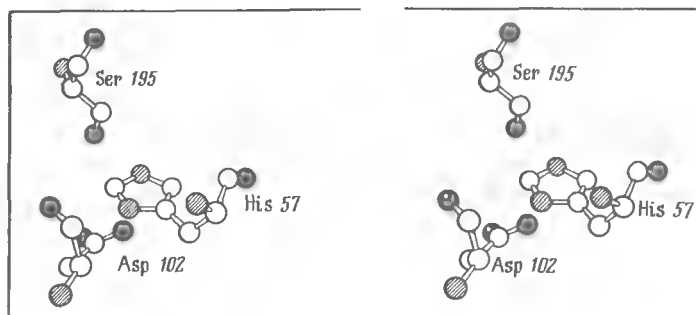


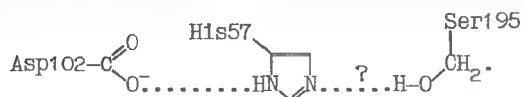
Рис.106. Стереопара расположения остатков Ser195, His57 и Asp102 в активном центре бычьего α -химотрипсина [1249]

трипсине [1243], калликреине [1243] и протеазе A *Streptomyces griseus* [3063] это расстояние составляет 2,7–2,9 Å.

Наконец, с помощью нейтронографического анализа трипсина и его комплекса с ингибитором, имитирующим тетраэдрическое промежуточное соединение, были получены [3182] прямые доказательства отсутствия переноса протона на Asp102, однако водородная связь между Ser195 и His57, по-видимому, существует [3183,3184].

Замена в трипсине остатка Asp102 на Asn [3185] методом направленного мутагенеза приводит к сильному (в $\approx 10^4$ раз) падению активности в нейтральной среде. Мутантный фермент почти не отличается по структуре от нативного [2124].

Таким образом, по крайней мере в свободном ферменте и, скорее всего, в фермент-субстратных комплексах "система переноса заряда" отсутствует, а каталитическая "триада" может быть описана схемой:



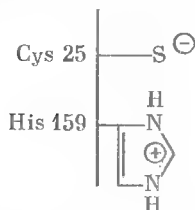
Квантово-химические расчеты [3186–3191] также подтвердили наличие высоких барьеров для переноса протона от Ser195 на His57. С представлением о функционировании Ser195 в неионизированной форме согласуются и данные химической модификации химотрипсина [3152], а также данные по влиянию растворителя на скорость деацилирования ацилхимотрипсина [3192].

По-видимому, роль Asp102–His57 водородной связи заключается в фиксации ориентации имидазольного кольца и распределения в нем электронной плотности, соответствующей выгодному для катализа строению π -таутомера [2350,3193]



а также в стабилизации положительного заряда на имидазоль-катионе на последующих стадиях катализа [2189].

У цистеиновых протеаз нет чего-либо подобного "системе переноса заряда". Как уже отмечалось выше (см. также разд.5.2.3), состояние каталитически активных групп в папаине отвечает структуре ионной пары



Ориентация имидазола, по-видимому, стабилизирована водородной связью N^{δ1}-атома с карбонильной группой остатка Asn175 [3122].

Нуклеофильность тиолат-ионов достаточно велика, и они могут эффективно реагировать с карбонильной группой субстрата. Исследования модельных реакций показывают, однако (см. разд.3.4.4), что тиолы довольно инертны в отношении реакций с амидами. Определенные трудности могут возникнуть также при описании последующих стадий катализа.

У аспартатных протеиназ карбоксильные группы остатков Asp32 и Asp215 лежат в одной плоскости и образуют между собой прочную водородную связь. Кроме того, каждый из атомов кислорода карбоксильных групп связан системой Н-связей с другими аминокислотными остатками и молекулами растворителя (см. рис.100). Так, карбоксильная группа Asp32 связана с гидроксильной группой Ser35 и NH-группой Gly34, а Asp215 - с гидроксилом Thr218 и NH-группой Gly217. Кроме того, атомы кислорода карбоксильных групп остатков Asp32 и Asp215 расположены на расстоянии, достаточном для образования водородных связей с двумя молекулами воды [3131,3194].

Как уже отмечалось выше, такая симметрия в расположении карбоксильных групп предполагает сходство в значениях их pK_a . Однако колоколообразная pH-зависимость катализа этими ферментами и другие факты свидетельствуют о различии в pK_a Asp32 и Asp215.

Причина этих различий может быть связана с тем, что отрыв протона, расположенного между этими остатками, приводит к появлению двух близко расположенных отрицательных зарядов, которые из-за системы водородных связей требуют большой энергии для их удаления одного от другого. Ситуация здесь напоминает ту, что наблюдается у конформационно закрепленных дикарбоновых кислот [2574,3165,3194].

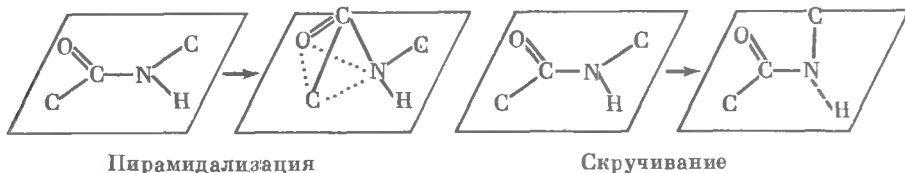
У металлосодержащих протеаз центральную роль в катализе играет ион Zn^{2+} . Этот ион может координировать 4-6 лигандов [3195], включая молекулу воды. Диссоциация координационно связанной воды, очевидно, происходит в области нейтральных pH (см. разд.5.2.3). Если именно эта молекула воды атакует субстрат, то в оптимуме pH функционирования ферментов этой группы концентрация ионов OH^- будет практически равна концентрации фермента. Однако нуклеофильность связанного с металлом иона OH^- (как и его pK_a) должна резко снизиться.

Таким образом, ни у одного из рассмотренных типов амидгидролаз нельзя ожидать высокой нуклеофильности атакующих субстратный карбонил каталитичес-

ких группировок. Эффективность нуклеофильной атаки должна достигаться за счет каких-то других механизмов.

7.3. Состояние расщепляемой группы субстрата

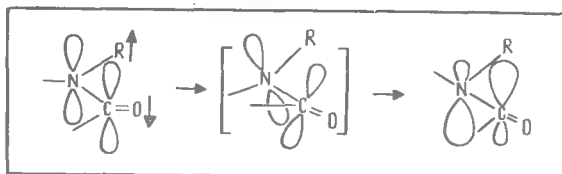
Увеличение реакционной способности гидролизуемой связи по отношению к слабым нуклеофилам возможно, если уменьшить степень резонансной стабилизации этой связи. Это, в свою очередь, должно происходить при выводе амидной связи из копланарности. Возможны два способа нарушения копланарности плоской амидной группы – "пирамидализация" (bending) и "скручивание" (twisting):



Оба способа ведут к изменению сопряжения свободной пары электронов атома азота и π -электронов карбонильной группы и различаются тем, что в первом случае карбонильный C-атом выходит из плоскости, образованной атомами O, C $_{\alpha}$ и N, а во втором – он остается в этой плоскости. Обе эти деформации, если они не очень велики, не требуют значительных энергетических затрат. Даже в случае этилена "скручивание" вокруг двойной связи C=C на 20° сопряжено с затратами около 2,5 ккал/моль [3196].

Проблема резонансной дестабилизации амидной группы в свободных пептидах и фермент-субстратных комплексах уже обсуждалась выше (разд.1.2.1, 3.3.1 и 6.5.2). Следует еще раз подчеркнуть, что степень пирамидализации зависит от расстояния между нуклеофилом и карбонильным углеродом амида [1469,3197] и, по-видимому, может существенно стабилизироваться вторичными взаимодействиями фермента и субстрата.

Рис.107. Изменение гибридизации в амидной группе при вращении вокруг связи C-N [3136]

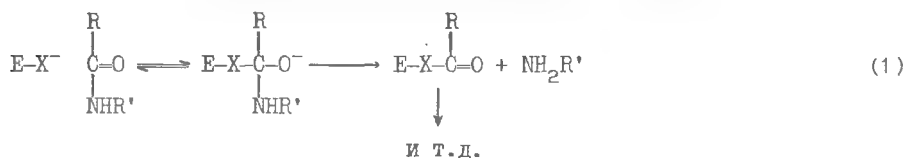


Таким образом, можно обоснованно полагать, что в комплексах ферментов с истинными субстратами может происходить заметное нарушение копланарности амидной связи и, следовательно, снижение энергии ее резонансной стабилизации.

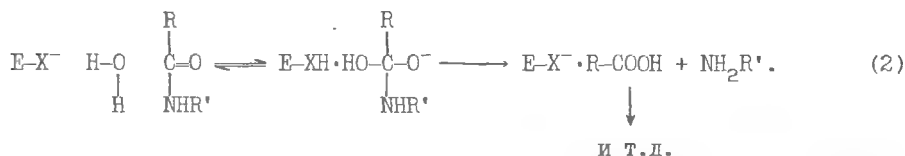
"Скручивание" амидной группы должно приводить к изменению гибридизации карбонильного C-атома и атома азота [3136] (рис.107), что делает неравноценными направления присоединения нуклеофила или протона.

7.4. Ковалентный или общий основной катализ?

Каталитически активная нуклеофильная группа фермента может выступать в качестве ковалентного катализатора, непосредственно атакуя карбонильный атом углерода субстрата:

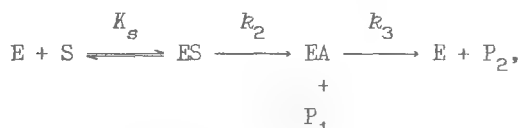


или же в качестве общего основного катализатора, способствуя отщеплению протона от молекулы воды:



В первом случае образующийся после распада промежуточного тетраэдрического соединения ацильный фрагмент субстрата остается связанным ковалентно с ферментом, тогда как во втором случае такая ковалентная связь отсутствует. Промежуточный ацилфермент в зависимости от соотношения скоростей его образования и распада может накапливаться или не накапливаться в ходе реакции.

Если ацилфермент накапливается в системе, то установить ковалентный тип катализа достаточно просто. Наиболее общий прием заключается в измерении каталитических констант для серии субстратов с одинаковой ацильной частью и разными уходящими группами. Действительно, в этом случае (см. разд.4.1.1) реакция идет по трехстадийной схеме:



где EA - ацилфермент; $k_{\text{cat}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$ и при $k_2 \gg k_3$ $k_{\text{cat}} = k_3$. Для всего ряда субстратов величина k_{cat} должна быть одинаковой [1666,1721]. Как видно из

Таблица 74. Кинетические константы катализируемого химотрипсином гидролиза производных ациламино кислот [1761]

Субстрат*	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$	$k_3, \text{с}^{-1}$
AcTrpOMe	27,7±0,5	730	29
AcTrpOEt	26,9±0,5	700	28
AcTrpONp	30,5±1,2	38 300	30,5
AcTrpNH ₂	0,026	0,026	30
AcPheOMe	57,5	280	72
AcPheOEt	63,5	530	72
AcPheONp	77,0	23 700	77
AcPheNH ₂	0,039	0,039	72

*ONp - п-нитрофениловый эфир.

данных, приведенных в табл.74, указанное постоянство значений k_{cat} действительно имеет место для ряда эфиров ациламинокислот – субстратов химотрипсина.

Для различных амидов ациламинокислот величины k_{cat} сильно различаются, что обусловлено несоблюдением неравенства $k_2 \gg k_3$.

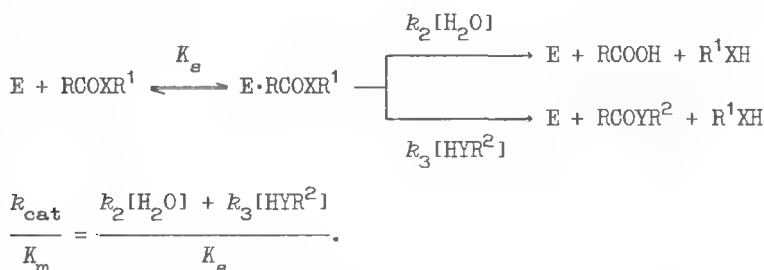
Этот метод был использован для большого числа сериновых и некоторых цистеиновых протеаз [1766,3198,3199]. Следует отметить, что эти исследования не всегда позволяют выявить характер лимитирующей скорости стадии [1427].

Иногда удается детектировать промежуточный ацилфермент с помощью спектральных методов в условиях, когда скорость его распада понижена, например в кислой среде [3200–3205] или в условиях криоэнзимологического эксперимента [2512,3206–3208] (см. также разд.5.7). Однако в этом случае не всегда удается надежным образом отличить ковалентное промежуточное соединение от прочного комплекса фермент–продукт. Были предложены [3205,3209] модификации спектральных методов, существенно повышающие их точность, в том числе и методы флуоресцентного анализа, использованные для идентификации ацилфермента при катализе β -лактамазой I [3210,3211].

Успешно применяется так называемый метод перехвата, т.е. образования из ацилфермента нового производного субстрата путем переноса ацильного фрагмента на нуклеофильный акцептор:



Эти реакции можно изучать кинетически, измеряя отношение k_{cat}/K_m для гидролиза субстрата в присутствии нуклеофильного акцептора. В случае если перенос имеет место, то константа скорости второго порядка зависит от концентрации акцептора:



Хорошим нуклеофилом для таких измерений является 1,4-бутандиол [1723].

Этот способ был успешно применен для идентификации ацилфермента при гидролизе эфиров бензоилглицина химотрипсином (HYR^2 – гидроксиламин) [3198,3212], однако его использование для доказательства образования ацилфермента при гидролизе амидов ациламинокислот химотрипсином натолкнулось на определенные трудности (ср.[3213] и [3214]). Лишь в 1973 г. этим методом были получены [1412] однозначные данные в пользу образования ацилфермента при химотрипсиновом гидролизе амидов. Эти же методы были использованы для доказательства промежуточного образования ацилферментов при катализе β -лактамазой [1856], *D*-аланилкарбоксипептидазой [2180,3215] и катепсином В [3216]. Для идентификации лимитирующей скорости стадии было также предложено [3217]

определять температурную зависимость k_{cat} и k_{cat}/K_m . Эти две величины одинаково изменяются с температурой, если медленной стадией является ацилирование фермента.

Использование метода "перехвата" и, в частности, его разновидности - реакции транспептидации [2169, 2177, 3218-3221], привело исследователей к убеждению о существовании "ацилфермента" (ангидрида E-CO-O-COR) и "аминофермента" (E-CONHR¹) при гидролизе пептидов пепсином и другими аспартатными протеазами. Образование "аминофермента" подтверждалось также исследованием начальных скоростей транспептидации субстратов, имеющих одинаковую переносимую группу (см. разд. 4.8.1). В дальнейшем было показано, что такие ковалентные промежуточные соединения при катализе пепсином не образуются. Следовательно, метод "перехвата" не всегда способен различить ковалентные и устойчивые нековалентные промежуточные соединения.

Еще один способ, имеющий, впрочем, тот же недостаток, основан на изучении упорядоченности отщепления продуктов гидролитической реакции по характеру ингибирования продуктами (см. разд. 5.8.3). Этот метод использовался [2175, 2587, 2604] для анализа механизма действия пепсина, однако полученные результаты были подвергнуты критике [2588].

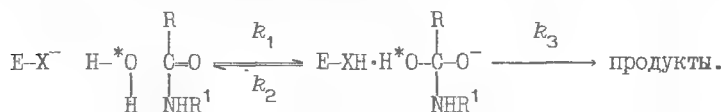
Предпринимались также попытки вынести суждение об образовании ковалентных промежуточных соединений на основе соотношений линейности свободных энергий [2010, 2012, 2013]. Такой анализ ограничивается системами, для которых известны стандартные изменения свободной энергии, и несвободен от ряда произвольных допущений.

Наконец, изучение влияния модификации фермента на амидазную и эстеразную активности может дать информацию о сходстве или различиях в механизмах гидролиза амидов и эфиров. Однако и этот метод дает далеко не однозначные результаты (ср. [3222] и [3223]).

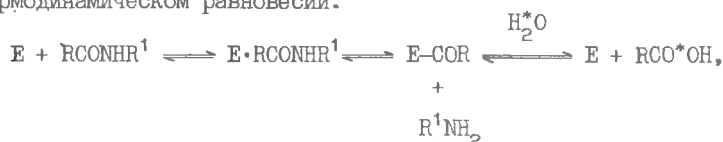
На мой взгляд, наиболее надежными методами установления типа катализа являются методы, основанные на изучении включения тяжелого кислорода из H₂¹⁸O в субстрат, продукт транспептидации или продукт гидролиза.

Действительно, механизмы (1) и (2) отличаются тем, что в первом случае вода участвует в реакции на стадии гидролиза ацилфермента, а во втором - на первой химической стадии процесса. Важным условием является то, что реакция идет по механизму ацилкислородного расщепления, установленного для модельных систем (см. разд. 3.3) и для гидролиза эфиров некоторыми протеазами [3224].

Включение ¹⁸O в субстрат можно изучать как в стационарном режиме [3225-3228], так и в условиях равновесия [1729]. В первом случае метка ¹⁸O может включаться в субстрат, лишь если вода участвует на первой химической стадии реакции, т.е. реакция идет по механизму (2). Здесь положительный результат свидетельствует о механизме (2), но отрицательный - не дает оснований для выводов, поскольку отсутствие включения в субстрат может быть следствием неблагоприятного соотношения скоростей образования (k_2) и распада (k_3) промежуточного тетраэдрического соединения:

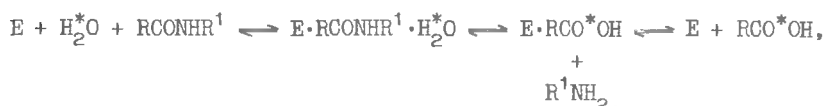


Если реакция идет через образование ацилфермента и система находится в термодинамическом равновесии:



то скорость включения ^{18}O в субстрат из $H_2^{18}O$ не может превышать скорости включения в субстрат ацильного продукта реакции, а скорость включения R^1NH_2 может быть существенно выше этой величины, так как последнее происходит независимо от включения ^{18}O .

Если же реакция идет без образования ацилфермента:



то включение ^{18}O в субстрат должно происходить с такой же скоростью, с какой включается R^1NH_2 . Используя радиоактивные продукты реакции и измеряя скорость включения радиоактивных меток и ^{18}O из тяжелоокислородной воды в субстрат при различных, но равновесных концентрациях субстрата и продуктов (метод Бойера, см. разд.4.5.1), было показано [1729-1731], что в ходе гидролиза AcPheGlyNH₂, катализируемого химотрипсином, реализуется первая из рассмотренных возможностей, т.е. реакция идет через ацилфермент.

По тем же причинам в случае механизма (1) не следует ожидать включения ^{18}O из $H_2^{18}O$ в продукты ацильного переноса или транспептидации, а если реакция идет по механизму (2), то такое включение должно наблюдаться. В табл.75

Таблица 75. Включение ^{18}O в продукты транспептидации [2040,3229,3230]

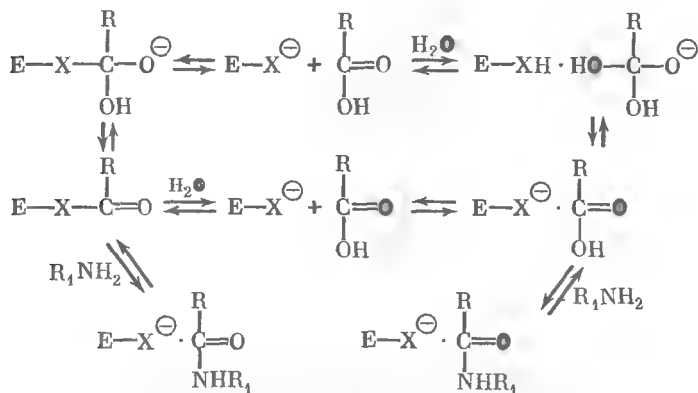
Фермент	Исследуемая реакция	Форма анализируемого продукта *	Обмен, %
Химотрипсин	$2LeuLeuNH_2 \rightarrow (Leu)_3 + LeuNH_2 + NH_3$	Tfa (Leu) ₃ OMe	0
Папаин	$ZGlyNH_2 + LeuGly \rightarrow ZGlyLeuGly + NH_3$	ZGlyLeuGlyOMe	0
	$ZGlyOMe + LeuGly \rightarrow ZGlyLeuGly + MeOH$	ZGlyLeuGlyOMe	0
Карбоксипептидаза Y	$ZPheOMe + HLeuNH_2 \rightarrow ZPheLeuNH_2 + MeO$	ZPheLeuNH ₂	0
	$ZPheAlaOH + HLeuNH_2 \rightarrow ZPheLeuNH_2 + Ala$	ZPheLeuNH ₂	0
Пепсин	$2LeuTyrNH_2 \rightarrow (Leu)_2 + 2TyrNH_2$	TMS (Leu) ₂ OTMS	56±10
Лейцинаминопептидаза	$2LeuNH_2 \rightarrow LeuLeuNH_2 + NH_3$	LeuLeuNH ₂	46±5
		^{18}O -LeuLeuNH ₂	55±5**
Термоллизин	$2LeuLeuNH_2 \rightarrow (Leu)_2 + 2LeuNH_2$	Tfa (Leu) ₂ OMe	47±5

*Tfa - трифторацетил, TMS - триметилсилил; вещества исследованы масс-спектрометрически. Использовалась вода, содержащая 60-80 атомных % ^{18}O .

**Использовался ^{18}O -LeuNH₂ и $H_2^{16}O$.

приведены данные, полученные [2040, 2189, 2574, 3227-3232] при исследовании этим методом гидролиза, катализируемого различными амидгидролазами. Все эти результаты показывают, что сериновые и цистеиновые протеазы функционируют по типу ковалентного (1), а аспартатные и металлосодержащие протеазы – по типу общего основного (2) катализа на стадии атаки субстрата молекулой воды.

Уже давно было показано (разд. 4.8.2), что многие амидгидролазы катализируют обмен кислорода в ацильном продукте гидролитической реакции. Само это обстоятельство некоторые авторы [2183, 3233, 3234] склонны рассматривать как свидетельство образования ацилфермента, другие же [2188] считают, что этот обмен может быть следствием синтеза (из ациламинокислоты и пептидов – продуктов автолиза или отщепления ацильной группы) нового пептида и последующего его гидролиза. На самом деле такие ферменты, как пепсин и лейцинаминопептидаза, функционирующие по механизму (2), способны катализировать ^{18}O -обмен в ацилфенилаланине и лейцине:

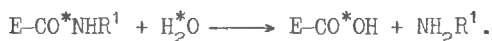


Как видно из схемы, добавление аминного продукта реакции (R_1NH_2) должно увеличивать скорость обмена ^{18}O в ацильном продукте лишь в случае, если реакция идет по механизму (2), за счет параллельно протекающего процесса синтеза-гидролиза пептида. Как видно из данных табл. 76, катализ пепсином, лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой А идет именно по этому механизму.

Очевидно, что вклад синтеза-гидролиза может быть заметным, лишь если его суммарная скорость сравнима со скоростью собственного обмена. Это видно на примере системы $\text{HLeuOH} + \text{NH}_4\text{Cl}$, где ускорение аммиаком не превышает ошибки опыта, поскольку скорость синтеза-гидролиза весьма низкая.

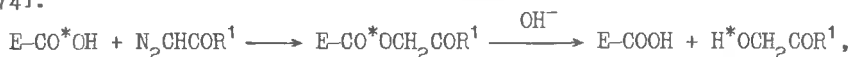
Все эти методы позволяют судить о наличии или отсутствии ацилфермента, но для суждения о промежуточном образовании "аминофермента" ($\text{E}-\text{CONHR}$) они непригодны.

Для этого необходимо убедиться в отсутствии включения ^{18}O в карбоксильные группы активного центра фермента, которое должно происходить при гидролизе аминофермента:



Отрицательные результаты в отношении включения метки в фермент в ходе гидролиза субстратов пепсином были получены при анализе продуктов, получающихся при мягком гидролизе специфически ингибированного фермента [2189,

25741:



а также методом прямого масс-спектрометрирования фрагментов пепсина и карбоксипептидазы А после их инкубации в H_2^{18}O в присутствии субстратов [3236].

Сходные методы были использованы для выяснения механизма действия аминокислотазы из почек свиньи [3237], аспарагиназы [3238], а также ферментов других классов [3239].

Таблица 76. Скорость обмена кислорода, катализируемого пепсином, лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой А [2189, 3228, 3235]

Фермент	Субстрат	Экспериментальное значение $V_{\text{макс}}$ обмена, $\text{М} \cdot \text{мин}^{-1}$	Вычисленное значение скорости обмена за счет синтеза-гидролиза*, $\text{М} \cdot \text{мин}^{-1}$
Пепсин	AcPheOH	$2,5 \cdot 10^{-5}$	—
	AcPheOH+HPhе(Ala)OMe	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$7,8 \cdot 10^{-5}$
Лейцинаминопептидаза	HLeuOH	$1,6 \cdot 10^{-3}$	—
	HLeuOH+ NH_4Cl	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-6}$
	HLeuOH+HLeuNH(CH ₂) ₂ OH	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
Карбоксипептидаза А	AcPheOH	$3,3 \cdot 10^{-6}$	—
	AcPheOH+HPhеOH	$11,6 \cdot 10^{-6}$	$9,9 \cdot 10^{-6}$

*Вычислено по формуле (1) в работе [2188].

Таким образом, у сериновых протеаз каталитически активная гидроксильная группа Ser195 является группой, атакующей расщепляемую связь амидных и эфирных субстратов. То же самое справедливо и для SH-группы остатка Cys25 цистеиновых ферментов.

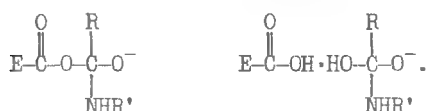
Атакующим нуклеофилом в случае аспартатных протеаз является молекула воды. Нуклеофильные каталитические группы этих ферментов выступают в качестве общих основных катализаторов, способствуя отщеплению протона от молекулы воды. Следует отметить, однако, что результаты опытов по включению ^{18}O в продукт транспептидации, катализируемой пепсином, ставились под сомнение [3240] и объяснялись сложной последовательностью реакций синтеза-гидролиза. Несмотря на это, общий основной катализ на стадии нуклеофильной атаки является в настоящее время общепризнанным.

В отношении карбоксипептидазы А, несмотря на многочисленные данные в пользу общего основного катализа атаки водой, связанной с ионом Zn^{2+} , при гидролизе как амидных, так и эфирных субстратов [3241–3244], приводятся аргументы, основанные, главным образом, на данных криоэнзимологии (см. разд. 5.7), в пользу промежуточного образования ангидрида между ацильным фрагментом субстрата и карбоксильной группой остатка Glu270 [2523, 3206, 3245–3248]. Для лейцинаминопептидазы и термолизина [2695] сомнений в общем основном катализе не возникает.

Для аминопептидазы М было постулировано участие фенольной оксигруппы тирозинового остатка в качестве нуклеофила, непосредственно атакующего субстратный карбонил и образующего с ацильным фрагментом субстрата сложноэфирную связь (ацилфермент) [3249].

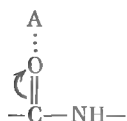
Были получены данные, указывающие на ковалентный катализ при гидролизе пепсином сульфидных эфиров [3221,3250,3251], однако они нуждаются в проверке.

Следует отметить, что участие карбоксильной группы в качестве ковалентного катализатора представляется мне маловероятным. Хотя имеются модели, где карбоксилат-ион выполняет именно эту функцию (см. разд.3.4.5), такие случаи ограничены образованием относительно устойчивых циклических ангидридов. Сравнение тетраэдрических промежуточных соединений, образованных карбоксильной группой и гидроксил-ионом, показывает, что распад первых в направлении исходных соединений должен быть значительно более эффективным (низкая основность COO^- -группы), чем во втором случае:



7.5 Электрофил

Одним из способов увеличения реакционной способности производных карбоновых кислот в гидролитических реакциях является электрофильный катализ. Этот тип катализа направлен на атом кислорода карбонильной группы и вызывает перераспределение электронной плотности так, что положительный заряд на атоме углерода увеличивается:



В случае сериновых протеаз, как уже отмечалось (см.разд.6.5.3), карбонильный кислород в фермент-субстратном комплексе занимает место в так называемом оксианионном кармане, образуя водородные связи с NH -группой Glu193 ($\approx 2,8 \text{ \AA}$ в химотрипсине) и NH -группой Ser195 ($3,2 \text{ \AA}$).

Сами по себе такие водородные связи не могут эффективно поляризовать карбонильную группу субстрата. Квантово-химические расчеты показали, что заряды на атомах амидной группы практически не меняются при образовании водородной связи карбонильным кислородом. Лишь протонирование карбонильного кислорода существенно изменяет заряды на атомах C, N и O, а также порядки связей C=O и C-N [3252].

Роль этих связей возрастает при образовании промежуточного тетраэдрического соединения, в котором карбонильный кислород приобретает целый отрицательный заряд. Появление заряда в неполярном окружении активного центра фермента крайне невыгодно. Однако наличие двух диполей N-H вблизи заряда значительно компенсирует эти энергетические потери [3253-3257].

Предполагалось, что аналогичную роль у цистеиновых протеаз играют NH-группа Cys25 и амидная группа боковой цепи остатка Gln19 [3258]. Следует, однако, отметить, что сравнение скоростей гидролиза кислородных $[RC(=O)OR']$ и тионовых $[RC(-S)OR']$ эфиров сериновыми и цистеиновыми амидгидролазами [3259, 3260] ставит под сомнение роль этих взаимодействий в стабилизации тетраэдрического промежуточного соединения цистеиновыми ферментами. В то время, как сериновые протеазы не способны гидролизовать тионовые эфиры из-за размеров атома серы, не позволяющего тиокарбонильной группе правильно разместиться в оксианионной полости, цистеиновые ферменты одинаково хорошо гидролизуют оба типа эфиров.

У металлзависимых ферментов роль электрофила, по-видимому, играет ион Zn^{2+} . Этот ион в карбоксипептидазе А и других сходных ферментах может включать в свою координационную сферу не только молекулы воды, но и атом кислорода карбонильной группы субстрата [3244, 3261, 3262]. Карбонильная группа, по-видимому, входит во внешнюю координационную сферу металла, смещая молекулу воды. Это подтверждается неспособностью Co^{3+} -карбоксипептидазы А с октаэдрической координацией металла связывать пептиды и эфиры [3263]. Аналогично связывание субстрата происходит у термолизина и дипептидилкарбоксипептидазы [3244]. У карбоксипептидазы А и термолизина остатки гистидина (His69 и His142 соответственно), связанные с ионом Zn^{2+} , своим $N^{\delta 2}$ -атомом образуют Н-связь с остатками аспарагиновой кислоты (Asp142 и Asp170), что может влиять на нуклеофильность ассоциированной с Zn^{2+} воды [3264].

Роль электрофила аспартатных протеаз приписывалась атому водорода, расположенному между карбоксильными группами остатков Asp32 и Asp215 [1345]. В связи со сказанным выше эффективное действие этого атома водорода на расщепляемую связь может быть лишь в том случае, если он протонирует атом кислорода субстрата, а не просто образует с ним водородную связь. Однако расстояние между этим протоном и карбонильным кислородом субстрата, по-видимому, слишком велико для образования прочной водородной связи. Теоретический расчет [3265], основанный на кристаллографических данных, не подтверждает возможности протонирования кислорода расщепляемой группы даже в тетраэдрическом промежуточном соединении. Согласно кристаллографическим данным кратчайшее расстояние между гидроксильным кислородом ингибитора, моделирующего тетраэдрическое соединение, составляет $2,7 \text{ \AA}$ [3073].

7.6. Нуклеофильная атака. Элементарный акт

Как было показано в разд. 7.2, у сериновых протеаз в продуктивном фермент-субстратном комплексе каталитически активная гидроксильная группа находится в нейтральной форме и не может ионизоваться путем переноса протона на имидзол His57, поскольку "система переноса заряда" отсутствует. Кроме того, хотя карбонильная группа и образует водородные связи с NH-группами Ser195 и Glu193, эти водородные связи лишь слабо поляризуют карбонил. В такой системе эффективность катализа не может быть высокой. По-видимому, основным фактором, обеспечивающим эффективное протекание реакции, является нарушение резонансной стабилизации расщепляемой связи. Есть все основания предполагать, что уже в основном состоянии реагирующей системы (в продуктивном фер-

мент-субстратном комплексе) резонансная стабилизация амидов нарушена, главным образом, за счет пирамидализации связи (см. разд.6.5.2).

При некоторой начальной степени пирамидализации, определяемой структурой фермент-субстратного комплекса, дальнейшее уменьшение резонансной стабилизации амида (и увеличении степени пирамидализации) зависит в основном от расстояния между карбонильным углеродом субстрата и O^{γ} -атомом серинового гидроксила (см. разд.3.3.1). Любая тепловая флуктуация, приводящая к сближению этих атомов, будет, с одной стороны, увеличивать степень пирамидализации амидной группы, повышая положительный заряд на карбонильном углероде и снижая π -порядки связей $C-N$ и $C=O$, а с другой – ослаблять связь $O-H$ в атакующей спиртовой группе, увеличивая тем самым ее нуклеофильность.

Такая флуктуация "автоматически" приведет к возникновению связи $O-C$, т.е. образованию тетраэдрического промежуточного соединения. Решающим здесь должно быть состояние амидной связи до начала реакции и исходное расстояние между O^{γ} (Ser195) и C' (карбонил). Можно думать, что специфичность субстрата определяется именно этими двумя факторами, и у наиболее специфических субстратов степень пирамидализации и $O^{\gamma}-C'$ -расстояние в основном состоянии системы оптимальны.

Изложенные представления о прохождении элементарного акта нуклеофильной атаки у сериновых протеаз согласуются с квантово-химическими расчетами

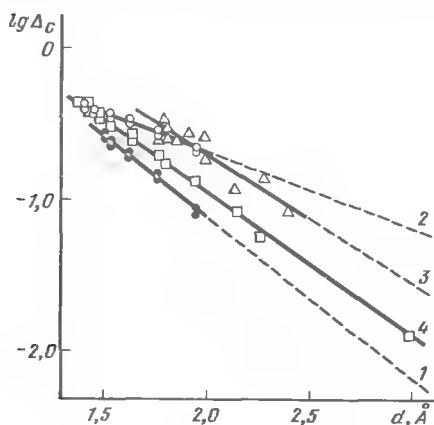


Рис.108. Зависимость степени пирамидализации (Δ_C) амидной группы в N-метилацетамиде от расстояния между нуклеофилом и карбонильным C-атомом

1- метанол; 2- метоксианион;
3- метилтиолатанион;
4- вода, формиат-ион [1477]

[1477,3266,3267]. Изменения степени пирамидализации амидной группы в зависимости от расстояния между различными нуклеофилами и карбонильным атомом углерода было рассчитано полуэмпирическим методом CNDO/2 (рис.108).

Экстраполяция полученных прямых на расстояния, превышающие 2,5 Å, показывает, что даже на таких расстояниях наблюдается индуктивное влияние заряженных нуклеофилов на состояние гибридизации карбонильного C-атома, приводящее к энергетически предпочтительной, частично пирамидализованной структуре амидной группы. В случае спиртового гидроксила на расстояниях, соответствующих сумме Ван-дер-ваальсовых радиусов спиртового кислорода и карбонильного углерода (около 3,2 Å; см. табл.66), степень пирамидализации все же очень мала ($\Delta_C < 0,007$). Можно, однако, предположить, что в случае "хороших" субстратов взаимодействия нереагирующих групп субстрата с ферментом могут привести к тому, что это расстояние в продуктивном фермент-субстратном комплексе будет меньше суммы Ван-дер-ваальсовых радиусов (ср. [3268]).

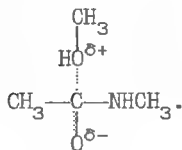
На рис. 109 показано изменение потенциальной энергии системы при взаимо-

действию метоксианиона и спиртового гидроксила с амидной связью N-метилацетамида. Следует подчеркнуть, что при расчетах сближение реагирующих атомов моделировалось таким образом, что p_z -орбиталь нуклеофила была направлена перпендикулярно к амидной группе. При этом на расстояниях около 2–2,3 Å наблюдается понижение энергии системы, обусловленное перекрыванием связывающих орбиталей реагирующих атомов. Реакция с метоксианионом завершается образованием ковалентной связи, тогда как в случае метанола понижение энергии

Рис. 109. Изменение потенциальной энергии при атаке метоксианионом (1) и метанолом (2) карбонильного атома углерода в N-метилацетамиде [1477]

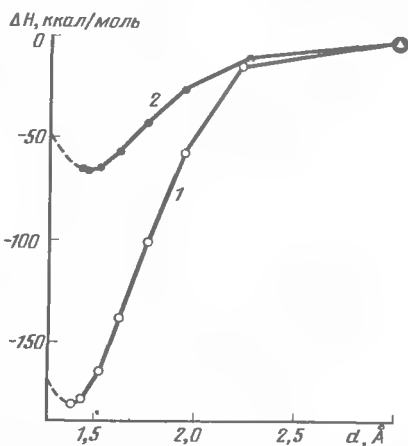
системы оказывается существенно меньшим и равновесная степень пирамидализации составляет 0,22 Å (в тетраэдре $\Delta_C = 0,47$ Å). Порядок связи между спиртовым кислородом и карбоксильным углеродом составляет в минимуме потенциальной кривой лишь 0,5.

Это соответствует расстоянию O—C' около 1,6 Å, и равновесная структура в этом случае может быть представлена формулой:



Дальнейшее продвижение системы по координате реакции невозможно без отрыва протона. Однако в системе создаются все предпосылки для акцептирования протона подходящим основанием, поскольку состояние атакующей группы близко к таковому у оксоний-катиона. Интересно отметить, что по данным рентгеноструктурного анализа комплекса трипсина и панкреатического трипсинового ингибитора [3044] расстояние между сериновым гидроксилом и карбонильным углеродом остатка Lys15 также больше длины ковалентной связи. Более того, расстояние между O γ -атомом и N ϵ^2 -атомом His57 в комплексе фермента с "пирамидализованным" субстратом, как показывают исследования комплексов трипсина и химотрипсина с белковыми ингибиторами [3044], становится достаточно близким для образования хорошей водородной связи, что обеспечивает дальнейший перенос протона на имидазольный остаток.

Таким образом, нуклеофильную атаку на карбонильный углерод субстрата можно представить себе как "саморазвивающийся" процесс, при котором любое продвижение по координате реакции способствует дальнейшему взаимодействию реагирующих атомов. Следует подчеркнуть, что выделение промежуточных состояний на пути от основного состояния системы к переходному лишено смысла,



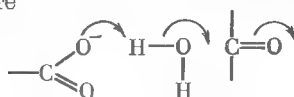
если процесс представляет собой действительно элементарный акт, происходящий за время флуктуации, т.е. за время порядка 10^{-12} – 10^{-13} с. Поэтому эффективность процесса в данном случае должна зависеть только от начального (основного) состояния системы – сближенности нуклеофила и карбонильного углерода и степени дестабилизации расщепляемой группировки. Этим, по-видимому, ферментативная реакция отличается от неферментативной, где удерживание реагирующих компонентов в положении, максимально благоприятном для реакции, невозможно из-за свободного теплового движения молекул. Фермент, следовательно, создает "рамку" или "коридор", направляющий элементарный акт строго по пути реакции.

Тот факт, что многие ферментативные реакции проходят с диффузионно-контролируемыми скоростями (см. разд. 4.4), является убедительным свидетельством весьма низких энергий активации собственно элементарного акта химического превращения субстрата. Для "идеальных" субстратов энергия активации этого акта, по-видимому, всегда ниже энергий активации диффузионно-контролируемых реакций (≈ 5 ккал/моль).

Сходной точки зрения на механизм нуклеофильной атаки у сериновых протеаз придерживается ряд других исследователей [1330, 3044, 3045, 3060, 3062, 3103, 3104]. Интересно отметить, что расщепление β -лактамного цикла в бензилпенициллине β -лактамазой из *Escherichia coli* происходит с константой скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) $\approx 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, т.е. со скоростью, близкой к диффузионно-контролируемой. Однако эффективность этого фермента ($k_{cat}/K_m \cdot k_n = 10^9$; см. табл. 50) не превышает эффективности других амидгидролаз. β -Лактамное кольцо в пенициллинах уже практически лишено резонансной стабилизации (см. разд. 1.3.1), и механизмы дестабилизации расщепляемой связи у этого фермента, по-видимому, не должны функционировать. Остается важный фактор эффективности – ориентация, т.е. расстояние между нуклеофилом фермента и карбонильным углеродом, которое должно быть оптимальным для эффективного катализа. Вероятно, невыполнение этого условия и приводит к низкой скорости гидролиза других неспецифичных для этого фермента субстратов.

Аналогичным образом, по-видимому, происходит атака субстрата тиолат-ионом в цистеиновых протеазах. Интересно отметить, что "искусственный" фермент тиолсубтилизин неактивен в отношении специфических субстратов, но скорость деацилирования арилакрилоилпроизводных (полученных ацилированием по SH-группе арилакрилоилимидазолами) выше, чем скорость деацилирования ацилсубтилизинов [3269]. Эту особенность объясняют более низкой нуклеофильностью тиолат-иона по сравнению с оксо-анионом, однако причины могут быть значительно сложнее [3270].

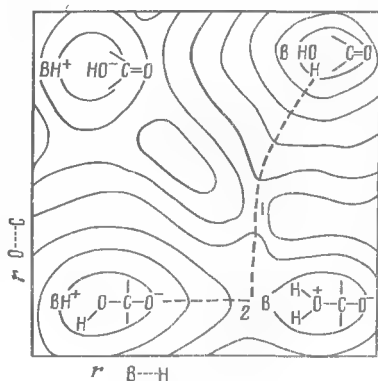
У аспартатных протеаз нуклеофильным агентом служит молекула воды. Крайне низкая нуклеофильность воды практически исключает эффективную атаку резонансно-стабилизированной амидной группы. В то же время ионизация путем переноса протона на карбоксилат-ион – процесс термодинамически невыгодный и может происходить лишь с очень низкой скоростью. Поэтому перенос протона и нуклеофильная атака должны происходить синхронно, в едином элементарном акте



Положение здесь в принципе аналогично положению в сериновых протеазах с той только разницей, что имидазол является более эффективным акцептором протона, чем карбоксилат-ион. Во всех случаях синхронного элементарного акта необходимо, по-видимому, учитывать величину коэффициента синхронизации (см. разд.3.4.9), который ограничивает число возможных синхронных перемещений тяжелых атомов в одном элементарном акте. Оценить эту величину для ферментативных процессов указанного типа довольно трудно, поскольку неизвестна величина энергии активации синхронного процесса. При $E_c=0$ максимальное число атомов, участвующих в синхронном элементарном акте, вряд ли может быть больше восьми [3271,3272].

Существует в принципе другая возможность, базирующаяся на изучении общего основного катализа в модельных соединениях [3273-3275], когда нуклеофильная атака и перенос протона проходят через два последовательных пере-

Рис.110. Движение протона по поверхности потенциальной энергии при общем основном катализе присоединения воды к карбонильной группе [3275]



ходных состояния (рис. 110). Определяющее скорость всего процесса присоединение воды, облегчаемое дестабилизацией расщепляемой группы, не сопряжено с переносом протона на общее основание. Возникающее при этом первое переходное состояние характеризуется наличием водородной связи с общим основанием. Дальнейшее движение нуклеофила по координате реакции приводит к второму переходному состоянию, где завершено образование нормальной связи нуклеофила с карбонильным углеродом, а протон, двигаясь также по координате реакции (так как он связан с общим основанием), оказывается на "полпути" к акцептору. Реакция завершается быстрым переносом протона на общее основание. Этот механизм согласуется с наблюдаемым кинетическим изотопным эффектом растворителя, так как существенной его особенностью является наличие Н-связи нуклеофила с общим основанием.

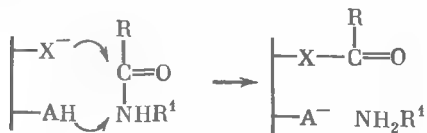
Если правильны представления о том, что в металлзависимых протеазах нуклеофилом является координированная с ионом Zn^{2+} вода и в координационную сферу металла входит карбонильный кислород субстрата, то у этих ферментов не возникает проблем, связанных с ионизацией нуклеофила и поляризацией карбонильной группы. Возможно, именно поэтому в фермент-ингибиторных комплексах металлзависимых протеаз пирамидализация амидной группы менее существенна, чем в сериновых ферментах.

Квантово-химические исследования [3276] показывают, что атом цинка может играть роль не только в поляризации карбонильной группы, но и в стабилизации промежуточного тетраэдрического соединения, нейтрализуя возникающий отрицательный заряд и делая связи с центральным атомом углерода более прочными.

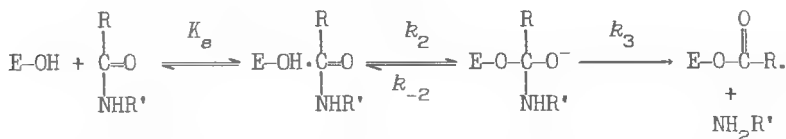
7.7. Промежуточное тетраэдрическое соединение

Нуклеофильная атака на карбонильный углерод субстрата завершается образованием тетраэдрического промежуточного соединения. Эти промежуточные соединения были идентифицированы при неферментативном гидролизе, главным образом, на основании результатов опытов по включению ^{18}O из тяжелоокислородной воды в субстрат (см. разд.3.3.2).

Альтернативным механизмом, не включающим образование тетраэдрического аддукта, является механизм типа $\text{S}_{\text{N}}2$:



Выбор между этими механизмами в случае ферментативного гидролиза достаточно сложен. Так, попытки обнаружить включение ^{18}O в субстрат в ходе химотрипсинового катализа, что свидетельствовало бы об образовании тетраэдрического промежуточного соединения, оказались безуспешными [3225]. Однако отрицательный результат здесь может свидетельствовать лишь о неблагоприятном соотношении скоростей k_{-2} и k_3 :

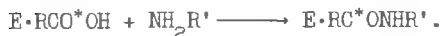


В этом случае наблюдаемая константа скорости образования ацилфермента

$$k_{ac} = \frac{k_2}{1 + k_{-2}/k_3} \quad (3)$$

и при $k_3 \gg k_{-2}$ $k_{ac} = k_2$, т.е. обмен практически наблюдаться не будет.

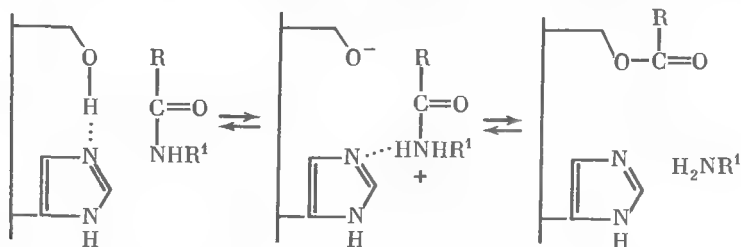
В реакциях, катализируемых лейцинаминопептидазой и пепсином, наблюдается значительное включение ^{18}O в непрогидролизированный субстрат [3228, 3231]. Детальное исследование этой реакции показало, что это включение является следствием реакции транспептидации, т.е. переноса ацильного фрагмента субстрата на образующийся в ходе гидролиза аминный продукт:



Это было доказано сравнением степени включения ^{18}O - и ^{15}N - (или ^{14}C -) меченных продуктов в исходный субстрат [2040, 3277]. Таким образом, исследования кислородного обмена в субстрате ни при отрицательных, ни при положительных результатах не являются свидетельством за или против образования тетраэдрического промежуточного соединения.

Механизм типа $\text{S}_{\text{N}}2$, включающий перенос протона на уходящую группу в предпереходном состоянии, был предложен для химотрипсина еще в 1967 г. [3278-

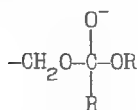
32801. Этот механизм предусматривает участие имидазола остатка гистидина в переносе протона с серинового гидроксила на азот амидной группы. Скорость реакции в этом случае должна зависеть от pK_a уходящей группы:



Действительно [1996,1998,3278,3281], электронодонорные заместители в анилиновом кольце замещенных анилидов N-ацетилтирозина увеличивают каталитическую константу ($\rho \approx -2,0$). Однако детальное исследование [2001] большой серии соединений, для которых значения pK_a уходящих групп варьируют в очень широких пределах, показало, что на самом деле такой зависимости нет (см. также разд.4.3.2.2). Наблюдавшаяся ранее зависимость, по-видимому, является артефактом, обусловленным узкими пределами значений pK_a и значительной степенью непродуктивного связывания анилидов [2000].

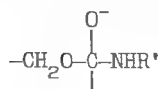
Представления о предпереходном переносе протона были подвергнуты критике [1999,2302,3282,3283]. Указывалось, что такой механизм не согласуется с отсутствием влияния отщепляемой группы на K_m , а также что требуемые этим механизмом скорости переноса протона (10^{13} – 10^{14} с $^{-1}$) недостижимы. В свете современных данных об отсутствии у сериновых протеаз системы переноса заряда эта концепция может быть признана несостоятельной.

Доводы в пользу образования тетраэдрического промежуточного соединения при катализе амидгидролазами были получены [1515,3284–3286] при изучении кинетического изотопного эффекта с помощью введения ^{15}N или ^{18}O в уходящую группу субстрата (см. обзор: [1405]). Основные выводы этих работ заключаются в том, что при гидролизе эфирных субстратов химотрипсина лимитирующей стадией является образование тетраэдрического промежуточного соединения, тогда как при гидролизе амидов лимитирующей стадией является преимущественно распад этого соединения [3287,3288]. В случае гидролиза бензоиларгининамида папаином изотопный эффект ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) согласуется с лимитированием гидролиза стадией распада тетраэдрического промежуточного соединения [3289]. Действительно, в случае субстратов с низкоосновными уходящими группами (эфиры, ангидриды) вероятность протонирования двух потенциальных уходящих групп



близка, величина k_2/k_3 [формула (3)] будет большой, а распад тетраэдра в направлении ацилфермента может быть медленным (k_3).

В случае алифатических амидов (пептидов)



различия в pK_a уходящих групп велики, и скорости образования (k_2) и распада (k_3) тетраэдрического промежуточного соединения могут быть сравнимы. С этими выводами согласуются данные по зависимости скорости ацилирования (и скорости переноса ацильной группы в ацилферменте на нуклеофильный акцептор) от pK_a уходящих групп (или pK_a акцептора) [1533, 1989, 3290–3292].

Аргументы в пользу образования тетраэдрических промежуточных соединений были выдвинуты на основе изучения реакций пептид-альдегидов, кетонов и ингибиторов – "аналогов переходных состояний" (см. разд. 5.8.7) с амидгидролазами [3293–3298]. Образование этих промежуточных соединений удалось установить в криоэнзимологических экспериментах на основе кинетических и спектральных данных [3299–3302], однако трактовка последних вызвала сомнения [3303].

Сам факт образования тетраэдрических соединений в ходе катализа и особенно кинетическая значимость их остаются предметом дискуссий. Так, высказывалось мнение [1501], что катализируемый сериновыми протеазами гидролиз пептидов (но не эфиров или анилидов) происходит по механизму типа S_N2 . С этим согласуются данные [3304] по изотопному эффекту гидролиза 4-метоксибензилформатов химотрипсином, указывающие на промежуточную между sp^2 и sp^3 гибридизацию карбонила в переходном состоянии.

Основываясь на значительном увеличении pK_a уходящей группы при образовании тетраэдрической конфигурации карбонильного углерода (см. разд. 3.3.3), можно предположить, что перенос протона с имидазола на уходящую группу происходит еще до формирования тетраэдрического промежуточного соединения, поскольку уже на ранних этапах его образования происходит выравнивание значений pK_a имидазола и уходящей группы. Однако изучение методом ^{13}C -ЯМР комплексов трипсина с галойдиметилкетонами [1160, 3305] и pH-зависимости ингибирования химотрипсина этими веществами [3298] показало, что pK_a имидазола в гидратированных комплексах, моделирующих тетраэдрическое промежуточное соединение, не менее 10.

Таблица 77. Энергии различных взаимодействий тетраэдрического соединения, образованного AcTtrX и химотрипсином [3306]

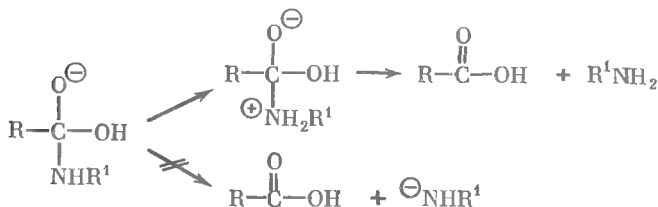
Взаимодействие	ΔH_o , ккал/моль		Разница (L-D)
	L-форма	D-форма	
Связывающая энергия	19,5	19,5	0
O ⁻ -атом с NH- Gly193 и CO- Met192	-5,3	-4,7	-0,6
O ⁻ -атом с NH- Ser195 и CO- Asp194	-5,2	-3,2	-2,2
O ⁻ -атом с CO- Ser214	0,6	0,8	-0,2
NH- Ac с NH- Gly193 и CO- Met192	-0,1	0,2	-0,3
NH- Ac с NH- Ser195 и CO- Asp194	-0,1	0,1	0,2
NH- Ac с CO- Ser214	-1,8	0	-1,8
Другие Ван-дер-ваальсовы взаимодействия	-113,6	-111,0	-2,6
Все несвязывающие взаимодействия	-125,5	-117,8	-7,7
Все связывающие и несвязывающие взаимодействия	-106,0	-98,3	-7,7

Тетраэдрическое промежуточное соединение в тех случаях, когда оно образуется, должно быть стабилизировано большим числом взаимодействий с ферментом. Методами молекулярной механики были рассчитаны энергии таких взаимодействий для производных *N*-ацетил-*L*- и *D*-триптофана (табл.77). Значительный вклад в стабилизацию тетраэдра вносят взаимодействия в оксианионной полости фермента [3306,3307]. Если допустить, что тетраэдрическое промежуточное соединение моделирует переходное состояние реакции, то полученная разница -7,7 ккал/моль для *L*- и *D*-форм объясняет различие в скоростях ацилирования фермента стереоизомерными производными ацетилтриптофана.

Косвенные оценки константы равновесия при образовании тетраэдрического промежуточного соединения дают величину порядка 10^{-6} [3254]. Однако эти оценки могут преуменьшать стабильность тетраэдра, особенно для специфических субстратов.

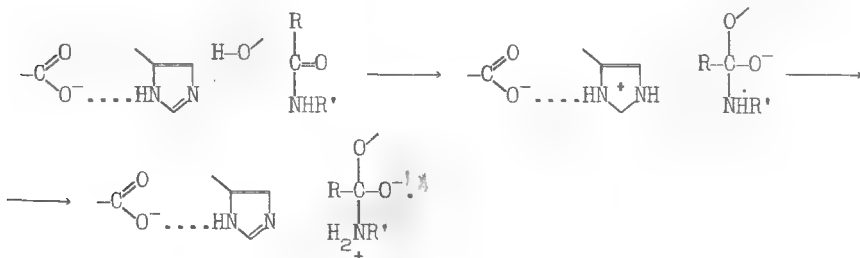
7.8. Перенос протона и распад тетраэдрического промежуточного соединения

Распад тетраэдрического промежуточного соединения (или S_N2 реакция) может происходить лишь в том случае, если уходящий амин присоединит протон. Уход амина в виде аниона невозможен из-за очень высокого значения pK_a сопряженного основания:



В неферментативных условиях распад тетраэдрических промежуточных соединений катализируется общими кислотами. Такой же катализ должен наблюдаться и в случае ферментативного гидролиза.

У сериновых и цистеиновых амидгидролаз донором протона является сопряженная кислота имидазола (His57 у химотрипсина) - имидазолий-катион [2350]. Следовательно, необходимо допустить синхронную атаку гидроксил-ионом и перенос протона на имидазол с последующим перемещением протона от имидазолий-иона на уходящую группу:



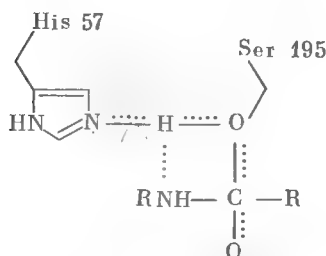
Возникает вопрос, не может ли протон быть перенесен прямо с серинового

гидроксила на уходящую группу. Выше было показано, что такой процесс в предпереходном состоянии невозможен (см. разд.7.7). Это обусловлено, главным образом, большим различием в pK_a спиртового гидроксила и амидного азота. В соответствии с уравнением (14) (см. разд.3.3.3), скорость такого переноса должна быть:

$$\lg k = 10 - [13,5 - (-2,5)] = -5,5, \text{ т.е. } k \approx 3 \cdot 10^{-6} \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}.$$

Однако очевидно, что по мере образования тетраэдрического промежуточного соединения pK_a атома азота уходящей группы будет увеличиваться. Как было показано выше (см. разд.7.6), атака спиртовой группой карбонильного углерода субстрата не может завершиться образованием ковалентной связи без отрыва протона и достигает равновесного O—C-расстояния $\approx 1,6 \text{ \AA}$, которое соответствует степени пириимидализации амидной группы $\Delta_c \approx 0,23 \text{ \AA}$. При этом значении, как показывают расчеты, величина pK_a уходящей группы составит около 6,5 [1500].

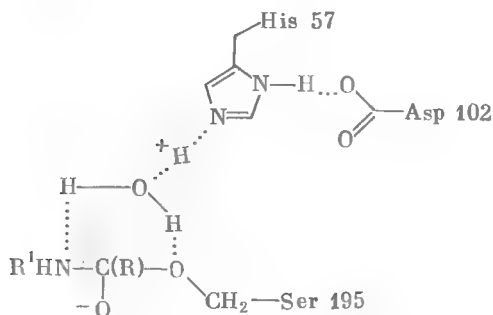
Исходя из нормальных значений pK_a имидазола, развивались представления [1790,3024,3309,3310] о синхронном переносе протона с гидроксила серина на уходящую группу, включающие переходное состояние типа:



Однако такое четырехчленное циклическое переходное состояние маловероятно по стерическим причинам.

Если же pK_a имидазола, как это предполагается [1160,3028,3160,3298,3305], увеличивается в тетраэдрическом промежуточном соединении на 2–3 единицы, образование этого соединения может полностью завершиться. Расстояние между атомами азота имидазола и уходящей группы в тетраэдре, судя по данным кристаллографии комплексов сериновых протеаз с ингибиторами – "аналогами переходных состояний", все же оказывается очень большим для эффективного переноса протона [3308]. Кроме того, как показывают квантово-химические расчеты [3311], перенос протона от O γ -атома Ser195 на N ϵ^2 -атом His57 сопровождается резким снижением энергии системы, и последующий отрыв протона должен быть связан с преодолением значительного активационного барьера.

Существует две возможности дальнейшего протекания процесса: 1) конформационные флуктуации в области активного центра, сближающие донор и акцептор протона [3308], и 2) участие в переносе протона промежуточного акцептора-донора, молекулы воды [3311]:



Квантово-химический анализ согласуется с обеими возможностями.

Устойчивость тетраэдрического промежуточного соединения определяется, с одной стороны, его "сольватацией", т.е. взаимодействием оксо-аниона с диполями NH-связей (Gly193 и Ser195 в химотрипсине), а с другой – эффективностью общего кислотного катализа его распада. Эффективность сольватации была исследована на моделях – продуктах взаимодействия сериновых протеаз с пептидоальдегидами [9,2860] и оценивается величиной ≈ 7 ккал/моль [9], однако большую часть этой энергии (≈ 5 ккал/моль) относят к внутримолекулярному характеру сольватации. Исследование кинетики деацелирования N-ацетилфенилаланил-(метил-N^{e2}-His57)-химотрипсина [3312] позволило оценить "эффективную концентрацию" общей кислоты (имидазола His57) в ферменте, которая равна $\approx 2 \cdot 10^6$ М. Отсюда следует, что эффективность общего кислотного катализа в ферменте очень велика и существенно выше, чем эффективность этого катализа в модельных системах.

Следует отметить, что перенос протона в реакциях ферментативного гидролиза, по-видимому, может происходить путем туннелирования (см. разд.5.5). С этим предположением согласуются данные по температурной зависимости изотопного эффекта растворителя.

При гидролизе эфиров или анилидов значение pK_a уходящей группы остается низким и в тетраэдрическом промежуточном соединении, и, по-видимому, нуклеофильная атака завершается образованием таких соединений. В случае эфиров возможно отщепление уходящей группы в виде алколят-иона ($pK_a \approx 15$), и его протонирование в "постпереходном" состоянии.

Как полагают [1476,1518,1519,3313], распад тетраэдра подвержен стерео-электронному контролю (см. разд.3.3.3). Вкратце эта концепция предусматривает сохранение конфигурации связи в ходе ацильного переноса. Иначе говоря, если гидролизу подвергается наиболее устойчивый в растворе эфир, имеющий Z-конфигурацию, то образовавшийся ацилфермент должен также иметь Z-конфигурацию. Это может происходить лишь в том случае, если конформация промежуточного тетраэдрического соединения такова, что отщепляемая группа имеет максимальное число антиперипланарных орбиталей по отношению к двум остальным группам тетраэдра (см. рис.35). Ситуация при химотрипсиновом катализе, возможно [1406], отвечает показанной на рис.111 и предусматривает существование стадии изомеризации промежуточных тетраэдрических соединений.

В случае папаина образование тетраэдрического промежуточного соединения при гидролизе амида было установлено на основании величины ^{15}N -изотопного

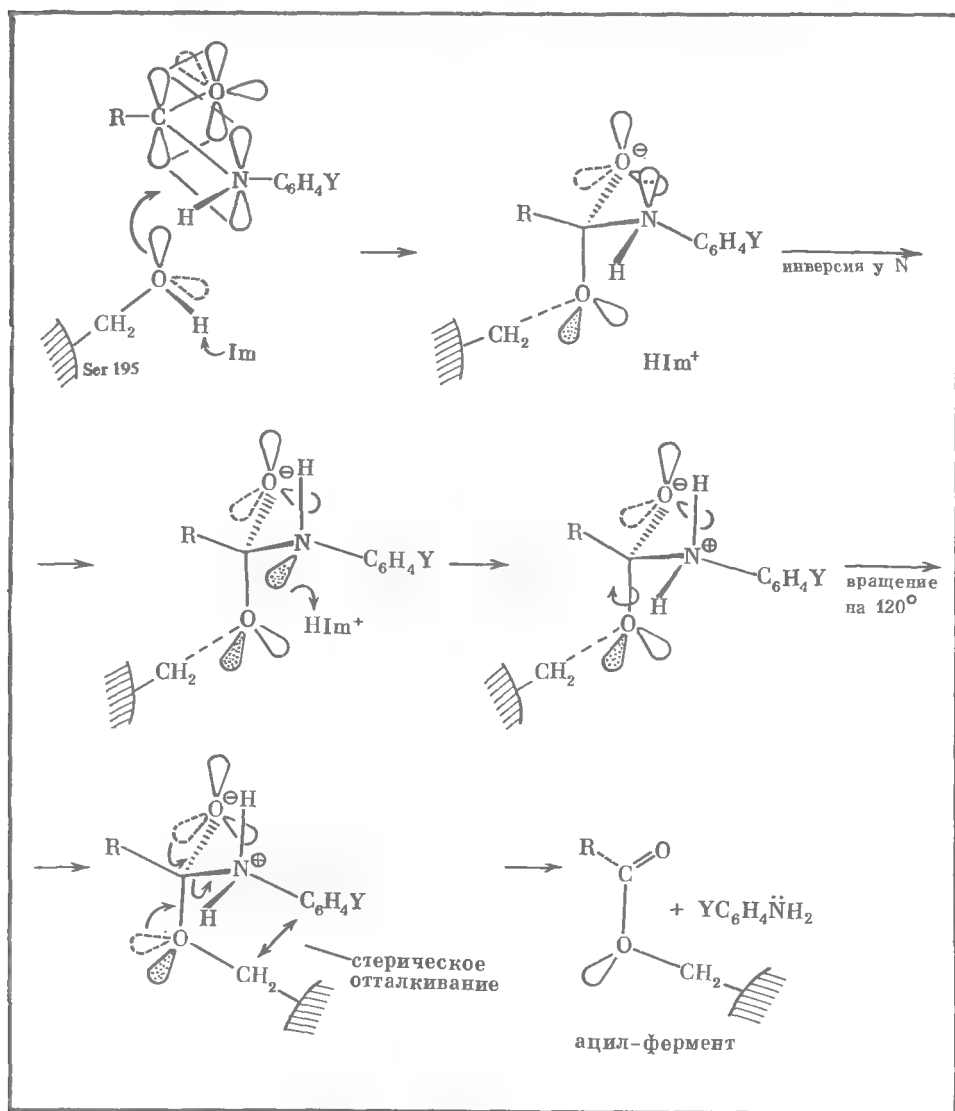
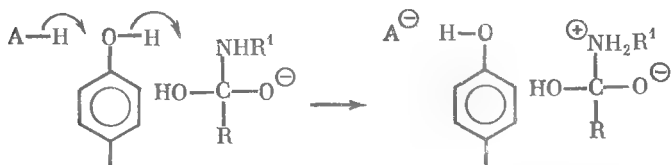


Рис.111. Схема ацилирования химотрипсина [1406], включающая стадии изомеризации промежуточных тетраэдрических соединений

эффекта. Отличие папаина от сериновых протеаз в этом отношении может иметь две причины. Во-первых, pK_a His159 резко снижается в отсутствие заряда на атоме серы (см. разд.7.1), что ведет к понижению концентрации имидзольных ионов в оптимуме действия фермента ($pH \approx 6$). Во-вторых, как это следует из анализа моделей комплекса папаина с субстратом (см. разд.6.5.3), в этом комплексе имеются неблагоприятные контакты уходящей группы с α -CH₂-группой His159. Это "давление" снимается в тетраэдрическом комплексе. Возможно, поэтому уже в основном состоянии фермент-субстратного комплекса расщепляемая связь довольно сильно искажена в сторону тетраэдрической (высокая степень

пирамидализации), так что атака сильным нуклеофилом (тиолат-ионом) завершается быстрым образованием тетраэдра.

Значительно меньше имеется сведений о катализе протонирования уходящей группы у аспартатных амидгидролаз. В случае пенициллопепсина предполагалось [1345] участие в этом процессе гидроксильной группы остатка Tyr75. Следует отметить, что перенос протона от фенольной группы тирозина в кислой среде возможен только по эстафетному механизму [3314]:



В структуре ферментов этого типа согласно рентгеноструктурным данным нет донорных групп типа AH, за исключением Asp215. Участие этой группы в катализе согласуется с pH-зависимостью реакции ($pK_{ES} \approx 4,5$). Этой группе ранее отводилась лишь роль электрофильного катализатора, поляризующего карбонильную группу субстрата.

По данным исследований комплекса квазисубстрата с пепсином остаток Tyr75 расположен вдалеке от места связывания лиганда [3128]. Положение же остатка Asp215 вполне согласуется с его ролью в качестве общего кислотного катали-

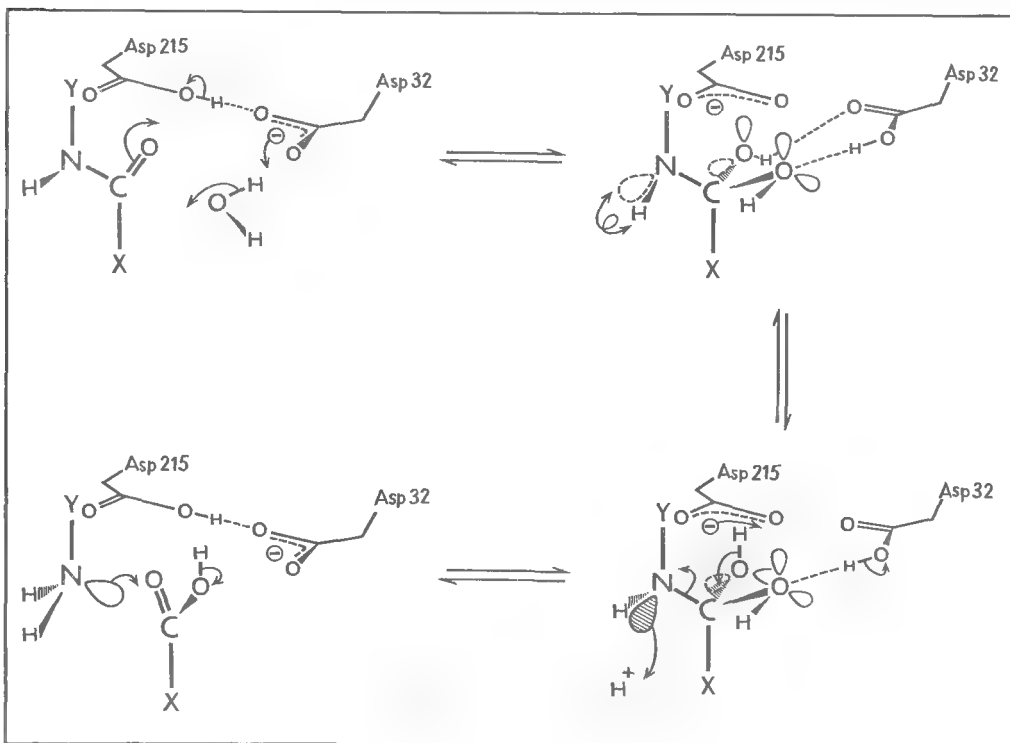
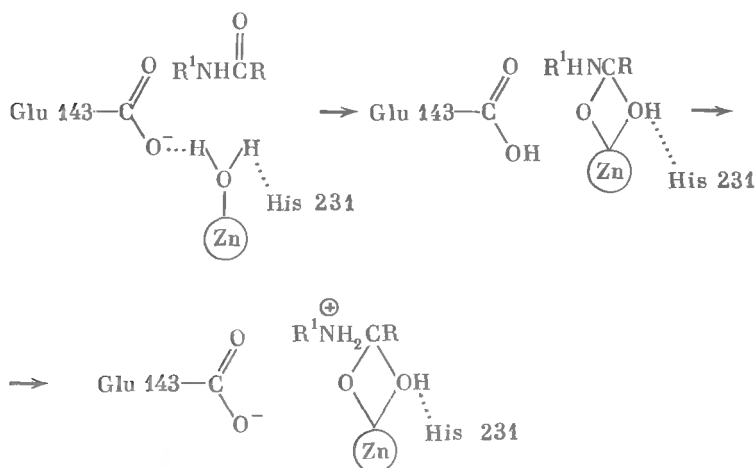


Рис.112. Возможный механизм действия аспартатных протеаз, включающий протонирование уходящей группы субстрата путем переноса протона от гидроксильной группы тетраэдрического промежуточного соединения [3131]

затора на стадии протонирования уходящей группы.

Очевидно, именно эта группа служит донором протона на уходящую группу [1715]. Это может происходить путем согласованного общего основного – общего кислотного катализа переноса протона от гидроксила тетраэдрического промежуточного соединения на Asp32 и переноса протона от Asp215 на уходящую группу [1715,3315] (см. разд. 7.10). Другой механизм [3131] заключается в переносе протона с одной гидроксильной группы тетраэдра на уходящую группу с участием протонов из среды (рис.112). Следует отметить, что согласно квантово-химическому изучению модели [3265], перенос протона от Asp215 на уходящую группу должен сопровождаться поворотом карбоксильной группы на $\approx 180^\circ$. Не исключено, что это достигается подвижкой доменов относительно друг друга в ходе катализа (см. разд.6.5.3).

Распад тетраэдрических промежуточных соединений у металлосодержащих амидгидролаз – карбоксипептидазы А, термолизина и дипептидилкарбоксипептидазы скорее всего катализируется карбоксильной группой (Glu270 и Glu143 у карбоксипептидазы А и термолизина соответственно) [3136,3137,3316,3317]. Предположения об участии в этом процессе остатка Tyr248 карбоксипептидазы А [149], как отмечалось выше, не подтвердились. Карбоксильная группа функционирует как общее основание, способствуя ионизации связанной с Zn^{2+} воды, и как общая кислота, перенося протоны на уходящую группу. У термолизина один из кислородов Glu143 расположен на расстоянии 3,2 Å от атома азота уходящей группы [3316]. Участие обоих атомов кислорода тетраэдра в координации с ионом Zn^{2+} объясняет неспособность метанола заменять воду в катализируемых металлосодержащими протеазами реакциях [3139]:



7.9. Ацилферменты и комплексы фермент-продукт

Распад тетраэдрических промежуточных соединений или реакции типа S_N2 в случае сериновых и цистеиновых амидгидролаз приводят к образованию ацилферментов:



Доказательства того, что ацилферменты являются промежуточными соединениями на пути от субстрата к продукту, были приведены выше (см. разд.7.4) В условиях насыщения фермента субстратом стационарная концентрация ацилфермента при гидролизе специфических эфирных субстратов практически равна концентрации фермента.

При гидролизе амидных субстратов ацилфермент не накапливается в системе. Стационарная концентрация N-ацетил-L-фенилаланилхимоотрипсина, образующегося при гидролизе N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида, при pH 5,5 составляет 0,15% [1730].

Одно время считалось, что ацилферменты - богатые энергией промежуточные соединения. Имеющиеся в настоящее время данные [1412,1730,3290,3318] показывают, что это не так. Например, изменение стандартной свободной энергии гидролиза N-ацетил-L-фенилаланилхимоотрипсина при pH 7,3 составляет -3,4 ккал/моль, а при pH 5,5 близко к нулю, тогда как изменение свободной энергии гидролиза метилового эфира ацетилфенилаланина при нейтральных значениях pH около -6,0 ккал/моль [1415]. Аналогичные данные были получены для неспецифических ацилхимоотрипсинов. Так, фурилхимоотрипсин примерно на 3 ккал на моль устойчивее O-фурил-N-ацетилсеринамида [3290], а гиппурилпапаин примерно на 8 ккал/моль устойчивее соответствующих тиоловых эфиров [3318].

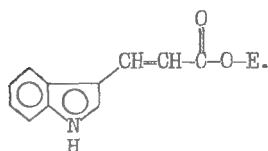
Образование ацилфермента - экзотермическая реакция: для ацетилхимоотрипсина $\Delta H^\circ = -7$ ккал/моль [3319] при pH 8,0. Предполагалось, что ацилирование химоотрипсина нитрофениловым эфиром уксусной кислоты идет сначала с образованием ацетилированного по имидазолу His57 производного, которое изомеризуется в O-ацетил-(Ser195)-химоотрипсин [3320]. Были получены данные, что деацилирование ацетилхимоотрипсина также идет в две стадии, однако в дальнейшем они были опровергнуты [3321].

Как уже отмечалось (см. разд.4.3.2.2), наблюдается компенсация энтальпии и энтропии активации процесса деацилирования ацилферментов с $T_c = 420^\circ\text{K}$ [3322], что объясняется, по-видимому, сольватацией переходного состояния в этой реакции.

Хотя изменение свободной энергии при гидролизе тиоэфиров несколько (на 2-3 ккал/моль) выше, чем кислородных эфиров, скорости их щелочного гидролиза различаются очень мало. Деацилирование неспецифических ацилпапаинов происходит несколько быстрее, чем соответствующих ацилхимоотрипсинов, но специфические ацилхимоотрипсины гидролизуются заметно быстрее ацилпапаинов [3323].

Деацилирование ацилферментов ставит те же проблемы, что и ацилирование, но в более острой форме. Поскольку нуклеофильным агентом в этих случаях является молекула воды, движущей силой эффективного деацилирования может быть или эффективный общий основной катализ, или же дестабилизация эфирной группы в ацилферменте.

Уже на ранних этапах исследования ацилхимоотрипсинов были обнаружены [1985] спектральные аномалии хромогенных неспецифических ацилхимоотрипсинов, которые могли свидетельствовать о дисторсии сложноэфирной группы. Это подтвердилось рентгеноструктурными данными [1328] β -(3-индолил)-акрилоилхимоотрипсина (см. также рис.113):



Анализ этих данных показывает, что сложноеэфирная группа заметно искажена: она пирамидализована ($\Delta_c = 0,3 \text{ \AA}$), а двугранный угол ω составляет всего лишь -122° .

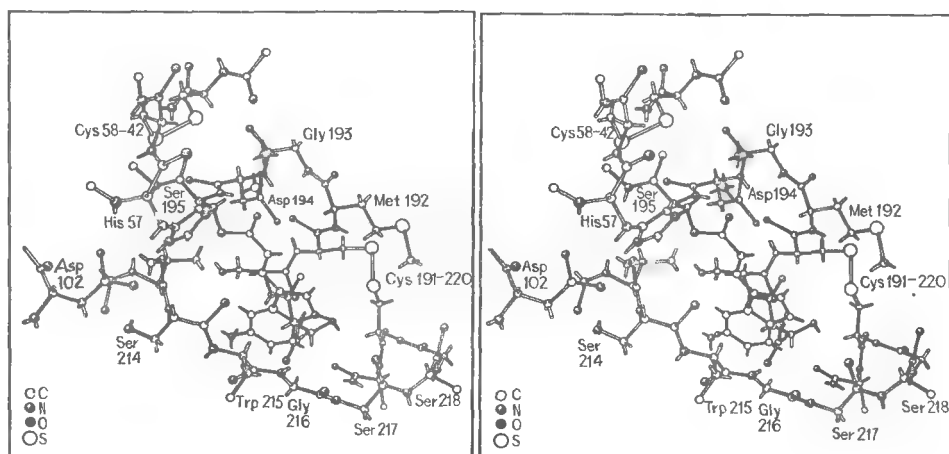


Рис.113. Стереомодель β -(3-индолил)-акрилоил- α -химотрипсина [1328]

Исследование резонансных Раман-спектров ряда ацилферментов [3100,3101] показало, что частоты сложноеэфирной группы близки частотам альдегидного карбонила. Сходные выводы были получены [3324] при изучении ЯМР-спектров селенсодержащих ацилхимотрипсина. Наблюдается корреляция между степенью поляризации карбонильной группы в ацилхимотрипсинах и скоростью их деацилирования [3325].

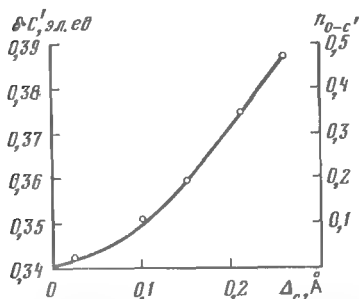


Рис.114. Зависимость заряда на карбонильном углероде в метилацетате и порядка связи между этим углеродным атомом и O-атомом атакующей молекулы воды от степени пирамидализации сложноеэфирной группы (рассчитано С.Л.Александровым методом CNDO/2)

Таким образом, по крайней мере у исследованных ацилферментов, а вероятно, и у других эфирная связь резонансно дестабилизирована. Пирамидализация сложноеэфирной группы приводит к изменению заряда на карбонильном C-атоме и порядка связи, образующейся между атомом кислорода воды и карбонильным углеродом (рис.114). Величина $\Delta_c = 0,3$ близка к величине пирамиальности пол-

ностью тетраэдрического углеродного атома. Возможно, что такая большая величина не реализуется в ходе гидролиза специфических субстратов химотрипсина, тем не менее дестабилизация сложноэфирной связи в ацилферменте может быть одной из причин высоких скоростей деацилирования (ср. [3326]).

Сложноэфирная группировка в индолилакрилоилхимотрипсине находится в несколько искаженной Z-конформации (см. рис.113). Это не согласуется с предположением [1985,3327] о E-конформации этой связи в производных замещенных акрилоилхимотрипсина, сделанным на основе спектральных изменений, происходящих при ацилировании фермента.

Расстояния между N^{ε2}-атомом остатка His57 и карбонильным C-атомом ацилфермента составляют по результатам рентгеноструктурных исследований [1221, 1328,3328] и данным конформационного анализа [3024] от 4,1 до 4,8 Å. Молекула воды в кристалле индолилакрилоилхимотрипсина расположена так, что она образует две водородные связи: 1) с N^{ε2}-атомом His57 и 2) с карбонильным кислородом сложноэфирной связи. Такое положение молекулы воды не является продуктивным, и в ацилферментах, подвергающихся быстрому гидролизу, вода должна занимать другое положение, которое, по-видимому, близко к положению уходящей группы в фермент-субстратном комплексе. Если это так, то расстояние между N^{ε2}-атомом His57 и атомом кислорода воды должно составлять 2,8-3,0 Å. Это расстояние отвечает наличию хорошей водородной связи и удовлетворяет условию эффективности общего основного катализа присоединения воды к карбонильной группе ацилфермента.

С общим основным катализом деацилирования согласуются стерические эффекты ацильной группы [1967]. Следует подчеркнуть, что реакционная способность молекулы воды, участвующей в деацилировании ацилферментов, содержащих специфическую ацильную группировку, близка к реакционной способности гидроксид-иона. Этот вывод был сделан [3329] на основе анализа скоростей деацилирования и щелочного гидролиза субстратов. Однако вопрос о том, обусловлена ли эта высокая реакционная способность особенностями структуры воды в активном центре ацилфермента или особенностями структуры расщепляемой связи, нуждается в дополнительном изучении.

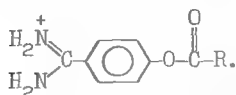
Нуклеофильная атака молекулой воды эфирной связи в ацилферменте приводит к тетраэдрическому промежуточному соединению. Реакция типа S_N2 здесь мало вероятна в силу низкого значения pK_a уходящей группы - серинового гидроксид-иона (pK_a R-OH-R ≈ 1). Образование тетраэдрического промежуточного соединения подтверждается зависимостью скорости деацилирования от pK_a замещенных ацилхимотрипсина (заместитель в ацильной группе) [3330].

Протонирование серинового гидроксид-иона при распаде образовавшегося тетраэдрического промежуточного соединения может происходить в "постпереходном" состоянии, т.е. сериновый гидроксил, будучи лучшей уходящей группой, чем гидроксильная группа присоединившейся молекулы воды (pK_a соответственно 13,5 и 15,5), может уходить в виде аниона и протонироваться имидазоль-катионом His57.

Исследование кинетического изотопного эффекта растворителя в смесях с разным соотношением H₂O и D₂O [2439,3177,3178,3331] дало основание утверждать, что при деацилировании неспецифических ацилхимотрипсина происходит перенос одного протона (k_H/k_D ≈ 2,5), но деацилирование высокоспецифичных

ацилферментов сопровождается переносом двух протонов. В случае хороших субстратов это было приписано функционированию системы переноса заряда (перенос второго протона между His57 и Asp102); однако более вероятным представляется участие в деацилировании одного из протонов, образующих Н-связь в оксианионной полости (см. также: [2438]).

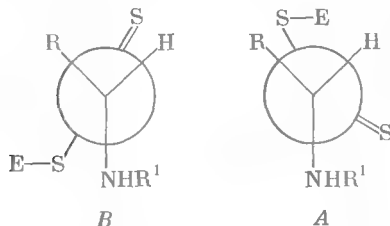
Ацилирование сериновых протеаз специфическими субстратами повышает "жесткость" белковой молекулы и снижает ее чувствительность к pH-зависимым конформационным переходам [3332]. Основную роль здесь играют боковые цепи остатка P₁ субстрата. Вместе с тем взаимодействие этих боковых цепей с участком их связывания в активном центре (S₁) приводит к конформационному изменению фермента, способствующему дальнейшему протеканию реакции. Это, в частности, было показано [3333, 3334] на серии так называемых обратных субстратов трипсина типа



Расщепление этих субстратов приводит к образованию ацилферментов с неспецифической группой COR, где R=CH₃, C₂H₅, C₃H₇ и др. Добавление к ацилферменту аминов заметно увеличивает скорость их деацилирования, причем использование флуоресцентно меченных групп R показало, что конформационное изменение увеличивает доступность ацильной группы воде.

В случае цистеиновых протеаз деацилирование ацилферментов происходит в целом по такому же механизму, как и деацилирование сериновых протеаз. Здесь возможны два основных отличия. Во-первых, pK_a остатка His159 в папаине (≈4,2) заметно ниже, чем pK_a His57 в химотрипсине (≈7), поэтому можно ожидать, что скорость переноса протона от воды на имидазол должна быть почти на три порядка ниже у цистеиновых ферментов по сравнению с сериновыми. Возможно, что это компенсируется большей степенью дестабилизации эфирной группы в тиоэфирах, однако, как это следует из данных резонансных Раман-спектров дитиоацилпапаинов [3102, 3335], связь C-S скорее укорочена за счет взаимодействия атома серы фермента с атомом азота P₁-остатка. Во-вторых, распад тетраэдрического промежуточного соединения в случае цистеиновых ферментов не требует протонирования уходящей группы. Уход группы -CH₂S⁻ сразу регенерирует активную форму фермента.

Ацилферменты цистеиновых протеаз существуют в двух конформациях - А и В, причем конформация В доминирует [3336]:



Две формы, по-видимому, существуют и у ацилхимотрипсинов [3337]. Динамика ацилферментов сериновых протеаз исследована в работах [3338-3340].

Образующийся в результате деацилирования комплекс фермент-продукт должен диссоциировать с образованием ацильного продукта и регенерацией свободного

фермента. Хотя сродство продуктов гидролиза к ферменту обычно близко к сродству субстратов, это не сказывается на скорости гидролиза вплоть до значительных степеней превращения субстрата, так как концентрация свободно-

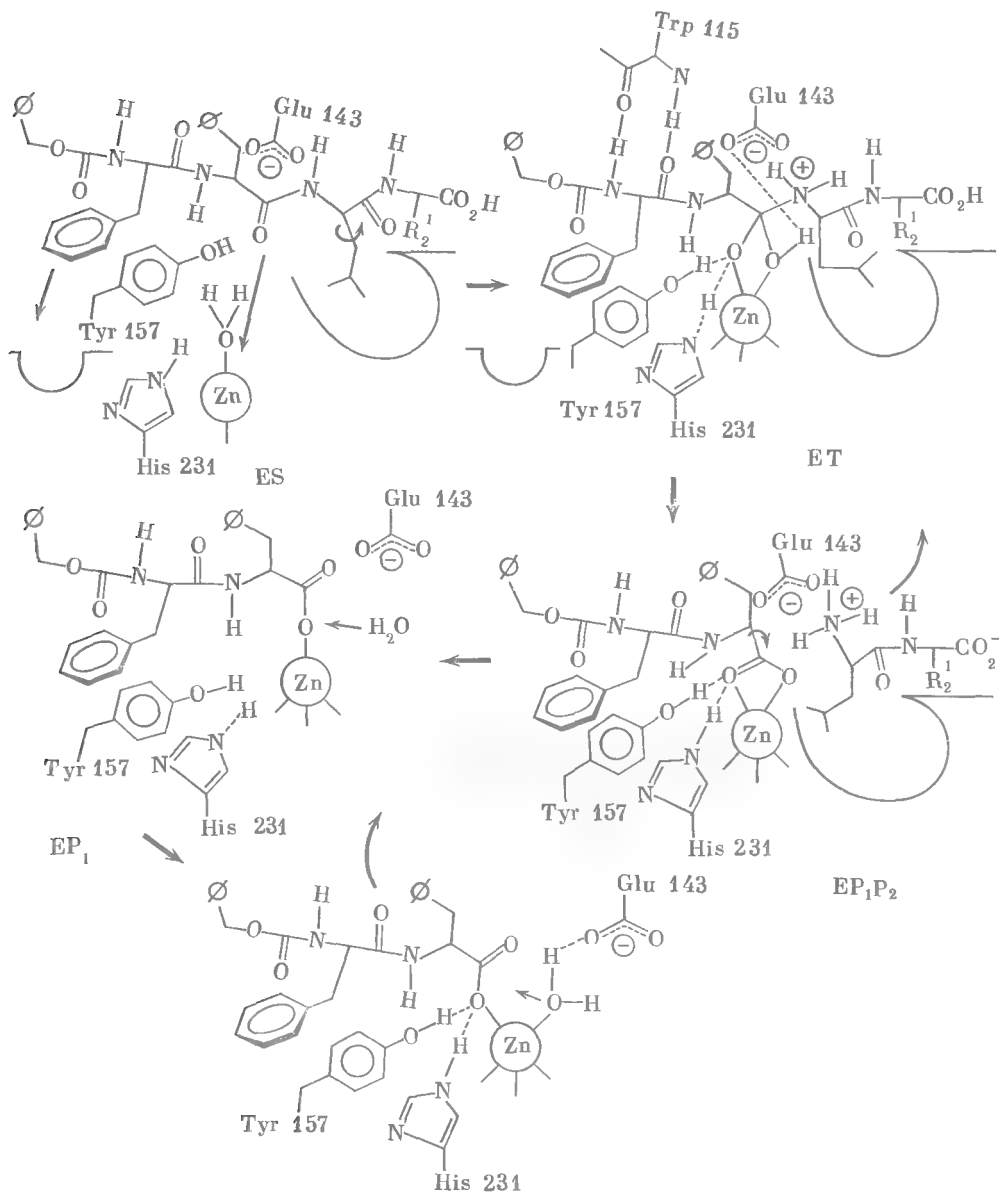


Рис.115. Механизм катализа термолизином [3316], включающий комплексы EP₁P₂ и EP₁, в которых образовавшаяся карбоксильная группа продукта остается включенной в координационную сферу металла

ES и ET – соответственно комплекс Михаэлиса и тетраэдрическое промежуточное соединение

го продукта остается низкой. Однако при высоких концентрациях продуктов скорость будет падать за счет конкурентного торможения продуктом. Не исключено, что, как и ассоциация фермента и субстрата (см. разд.6.2.3), диссоциация комплексов фермент-продукт происходит ступенчато. Этот вопрос будет подробнее рассмотрен ниже. Кроме того, учитывая низкую свободную энергию гидролиза ацилфермента при кислых значениях pH, следует иметь в виду, что в этих условиях деацилирование будет происходить весьма медленно, накопление продукта может приводить к обращению реакции и образованию ацилфермента [2003,3341]. Действительно, рентгеноструктурный анализ комплексов протеазы А из *Streptomyces griseus* с продуктом показал [3063,3129], что карбоксильная группа продукта образует Н-связь с имидазоль-катионом His57. Эта связь стабилизирует комплекс и ее разрушение (при нейтральных pH) способствует диссоциации продукта.

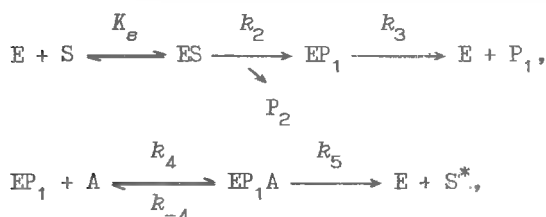
Как было показано выше (см. разд. 7.4), пепсин, лейцинаминопептидаза, термолизин и карбоксипептидаза А (амидные субстраты) функционируют по типу общего основного катализа на стадии нуклеофильной атаки карбонильной группы гидролизуемых соединений. При этом, очевидно, исключается образование ацилферментов. Что касается гидролиза сложноэфирных субстратов карбоксипептидазой, то в условиях криоэнзимологического эксперимента были получены данные, которые трактовались как свидетельство промежуточного образования ацилфермента - ангидрида, образованного карбоксильными группами фермента и субстрата. Эти данные нуждаются, однако, в подтверждении (см. разд.7.4).

Как указывалось выше (см. разд.6.2.3), при катализе гидролиза пептидных субстратов карбоксипептидазой А четко прослеживается образование по крайней мере двух комплексов фермента с субстратом. В случае же эфирных (депептидных) субстратов второй комплекс является, скорее всего, комплексом фермента с продуктами гидролиза, т.е. лимитирующей скорость стадий процесса в этом случае является диссоциация продуктов [3242]. По-видимому, в случае металлзависимых амидгидролаз образовавшаяся при гидролизе карбоксильная группа субстрата остается в координационной сфере металла и лишь затем вытесняется молекулой воды. Механизм такого отщепления в случае термолизина показан на рис.115 [3316].

Отсутствие ковалентных промежуточных соединений в указанных выше случаях ставит вопрос о механизме ацильного переноса и транспептидации. Сам факт катализа амидгидролазами таких реакций долгое время служил основным аргументом в пользу образования промежуточных ковалентных ацилферментов, а у аспартатных протеаз - и "аминоферментов" [1749,1750,2173,2177,2178,3342,3343]. Реакции транспептидации были объектом детального изучения (см. разд. 4.8.1).

Если реакции переноса идут из нековалентных комплексов фермент-продукт, то стабильность этих комплексов должна быть достаточно высокая, чтобы обеспечить связывание акцептора транспептидации и образование химической связи между переносимым фрагментом и акцептором. Располагая данными о начальных скоростях транспептидации [1667] и константах диссоциации комплексов фермент-продукт, можно оценить выполнимость этого условия.

Кинетическую схему транспептидации можно представить в виде:



где S - субстрат; S* - продукт транспептидации; P₁ и P₂ - соответственно первый (переносимый) и второй продукты гидролиза; A - акцептор транспептидации.

Отношение скоростей гидролиза и транспептидации дается уравнением

$$\frac{v_h}{v_t} = \frac{k_3 k_{-4}}{k_4 k_5} \frac{1}{[A]_0}.$$

Если допустить, что $k_3 \approx k_{-4}$, то можно вычислить константу скорости распада комплекса фермент-продукт (EP₁):

$$k_3 = \sqrt{\frac{v_h}{v_t} k_4 k_5 [A]_0}.$$

Полученные результаты для некоторых реакций транспептидации представлены в табл.78. В расчетах принималось значение $k_4 \approx 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, а остальные данные были взяты из работы [1667].

Таблица 78. Константы скорости распада комплекса пепсин-продукт. Акцептор - Phe(NO₂)OH; [A]₀ = 0,667 мМ; pH 4,6; 37°C

Субстрат*	v_h/v_t	$k_5, \text{ c}^{-1}$	$k_3, \text{ c}^{-1}$
AcPheTyrOH	22,0	$5,1 \cdot 10^{-4}$	8,65
AcTyrTyrOH	22,2	$4,9 \cdot 10^{-4}$	8,5
AcPhePheApm	351	$7,75 \cdot 10^{-4}$	42,5
GlyGlyPhePheApm	380	$8,1 \cdot 10^{-4}$	45,3

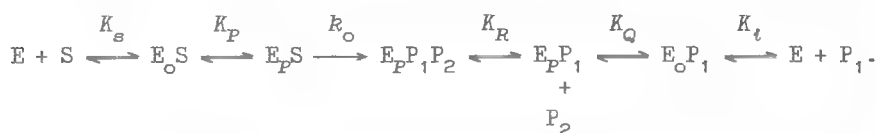
*Apm - 3-(морфолинопропил)-амид.

Данные табл.78 показывают, что константы скорости распада комплекса фермент-продукт, необходимые для обеспечения наблюдаемых скоростей транспептидации, лежат в области 10-50 с⁻¹.

Экспериментально определяемые константы скорости диссоциации комплексов фермент-продукт (или фермент-ингибитор) составляют $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$, что на три-четыре порядка выше необходимых для транспептидации. Таким образом, обычный комплекс фермент-продукт не может быть тем комплексом, который участвует в реакции переноса фрагмента субстрата на акцептор.

Это противоречие можно разрешить, если предположить, что на пути превращения субстрата в продукт возможно не только ступенчатое образование про-

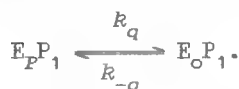
дуктивного фермент-субстратного комплекса (см. разд. 6.2.3), но и ступенчатая диссоциация комплексов фермента с продуктом:



В этом случае кажущаяся константа диссоциации комплекса $E_P P_1$ будет:

$$K_t' = \frac{K_t K_Q}{1 + K_Q}, \quad \text{где } K_{\square} = \frac{[E_O P_1]}{[E_P P_1]}.$$

Если $K_Q \gg 1$, то наблюдаемая константа ингибирования продуктом $K_t' = K_t$, т.е. характеризует лишь образование комплекса $E_O P_1$. Превращение $E_O P_1$ в $E_P P_1$ лимитируется в этом случае низкой константой скорости (k) в реакции:



Если превращение $E_P P_1$ в $E_O P_1$ идет с константой скорости ($k_q = k_3$) порядка $10-50 \text{ с}^{-1}$, то при $K_Q > 1$ k_{-q} должна быть меньше указанных величин.

Таким образом, можно предположить, что транспептидация происходит в комплексе $E_P P_1$, способном связывать акцептор. Образование этого комплекса легко идет из субстрата в ходе его гидролиза. Если же в системе субстрата нет, то образование комплекса $E_P P_1$ ограничивается низкой скоростью превращения $E_O P_1$ в $E_P P_1$. В этом случае продукт и акцептор могут реагировать, образуя новый пептид в количестве, определяемом константой равновесия всего процесса.

Очевидно, что комплекс $E_P P_1 P_2$ может распадаться, элиминируя не только P_1 , но и P_2 . В зависимости от относительного сродства обоих продуктов в этом комплексе может происходить реакция ацильного переноса или аминопереноса. Так, в случае пепсина и субстратов со свободной карбоксильной группой рядом с гидролизуемой связью происходит преимущественно аминоперенос, а у субстратов со свободной аминогруппой наблюдается, в основном, ацильный перенос [2176-2178].

Собственно акт образования новой пептидной связи должен в соответствии с принципом микроскопической обратимости происходить по механизму, в точности обратному механизму гидролиза.

Стадийность распада комплексов пепсина с продуктами подтверждается сравнением стационарных и предстационарных скоростей гидролиза флуоресцентных пептидных субстратов этого фермента [2976].

7.10. Механизмы ферментативного гидролиза в сравнительном аспекте

Механизмы ферментативного гидролиза принципиально не отличаются от механизмов гидролиза в модельных системах. Ни в том, ни в другом случае мы, к сожалению, не можем утверждать, что механизм реакции нам в точности известен, т.е. известно положение в пространстве и распределение электронной плотнос-

ти для каждого атома реагирующей системы в каждый момент времени реакции. Ферментативные системы имеют в этом отношении даже некоторые преимущества перед реакциями в растворе, поскольку, используя различные аналоги субстрата, можно в принципе получать рентгеноструктурные "снимки" отдельных стадий процесса.

На рис.116-119 даны схемы ферментативного гидролиза, которые, по мнению автора, в наибольшей степени соответствуют всей сумме имеющихся данных.

Важнейшей стадией ферментативного гидролиза является образование фермент-субстратного комплекса. Этот процесс проходит в несколько (по крайней мере, в две) стадий. На первой стадии реализуются в основном неспецифические и дальнедействующие взаимодействия (гидрофобные, электростатические), а на второй - происходит более тонкая "подстройка" субстрата и активного центра фермента, включающая образование новых связей и конформационные изменения как субстрата, так и фермента. Результатом этого процесса является образование продуктивного фермент-субстратного комплекса.

Общим для большинства исследованных амидгидролаз является наличие определенной локализованной области связывания одной боковой цепи пептидного субстрата, обычно принадлежащей аминокислотному остатку, расположенному рядом с гидролизуемой связью. Это так называемые гидрофобные карманы, наиболее четко выраженные у ферментов химотрипсиновой группы, но имеющиеся также у ферментов со "щелевым" типом связывающего участка. В этом "кармане" могут

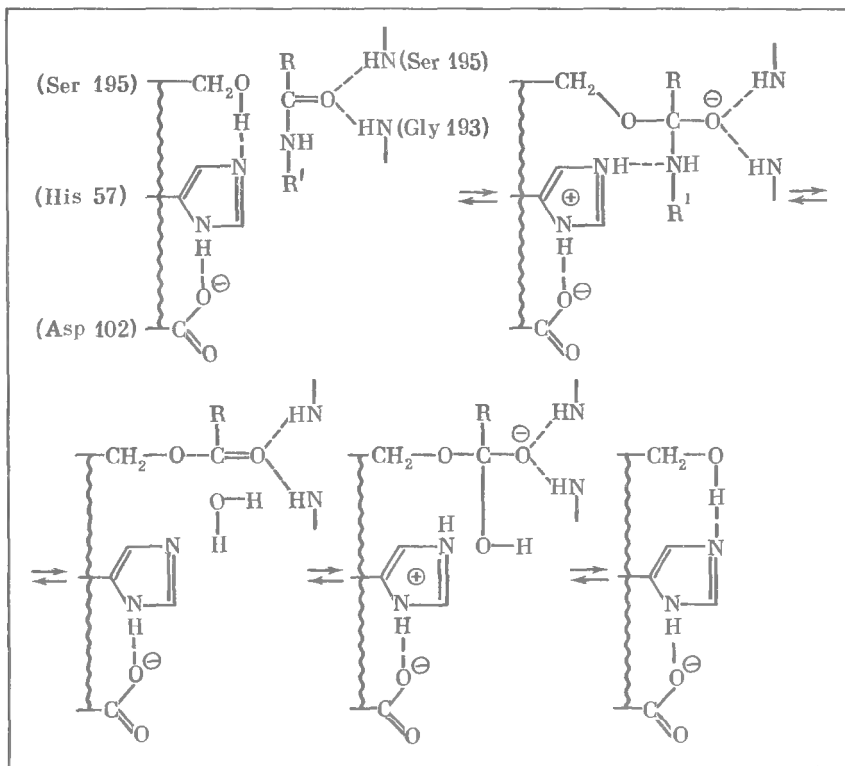


Рис.116. Схема механизма катализа α -химотрипсином

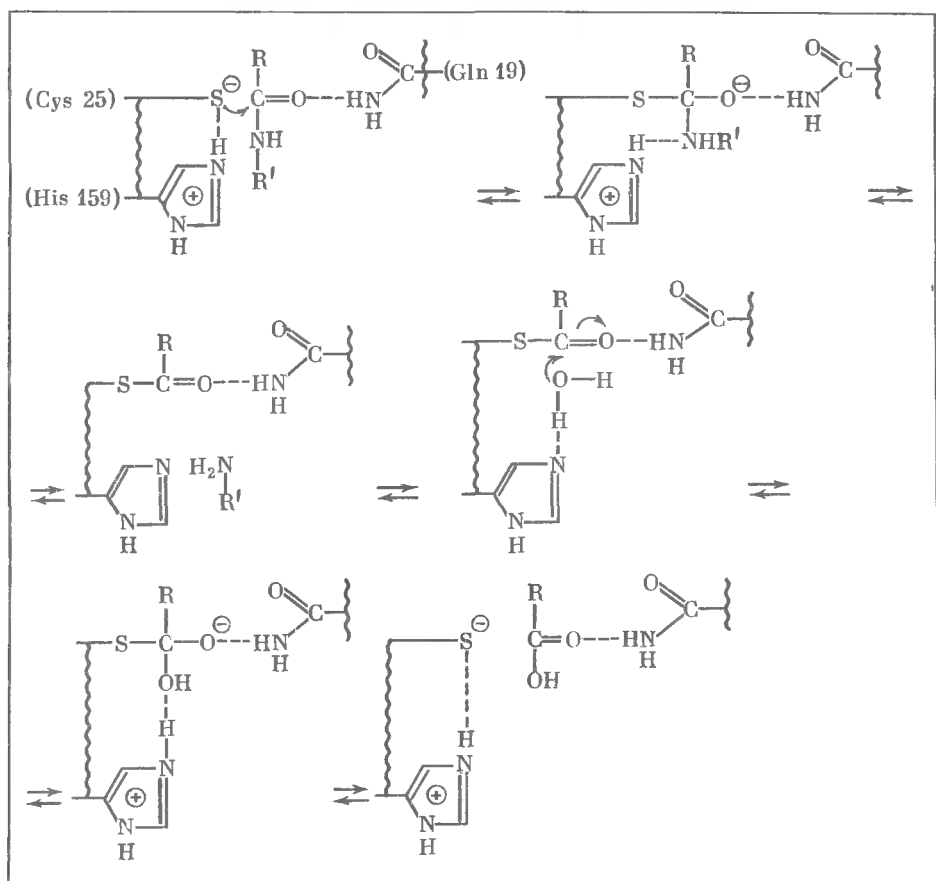


Рис.117. Схема механизма катализа папаином

располагаться заряженные группировки (трипсиноподобные ферменты) или алкильные цепи (эластаза и др.), ограничивающие его размеры.

У всех протеаз в большей или в меньшей степени развиты участки вторичной специфичности, связывание субстрата с которыми происходит путем образования водородных связей. Связывание пептидных субстратов происходит без существенного изменения конформации их основной цепи. Это, вероятно, имеет важное значение в реакциях гидролиза связей в нативных белках (ограниченный протеолиз, активация зимогенов и т.д.).

Наконец, есть все основания полагать, что связывание в активном центре фермента приводит к искажению планарной структуры расщепляемой связи субстрата за счет вращения вокруг связи C-N и за счет пирамидализации. Это искажение должно быть значительным у сериновых и аспартатных протеаз, имеющих слабые атакующие нуклеофильные группы и, может быть, менее выраженным у металлосодержащих ферментов из-за наличия сильного электрофила (Zn^{2+}), поляризующего расщепляемую связь.

По типу катализа амидгидролазы могут быть разделены на две большие группы – функционирующие по типу ковалентного катализа, куда входят сериновые и

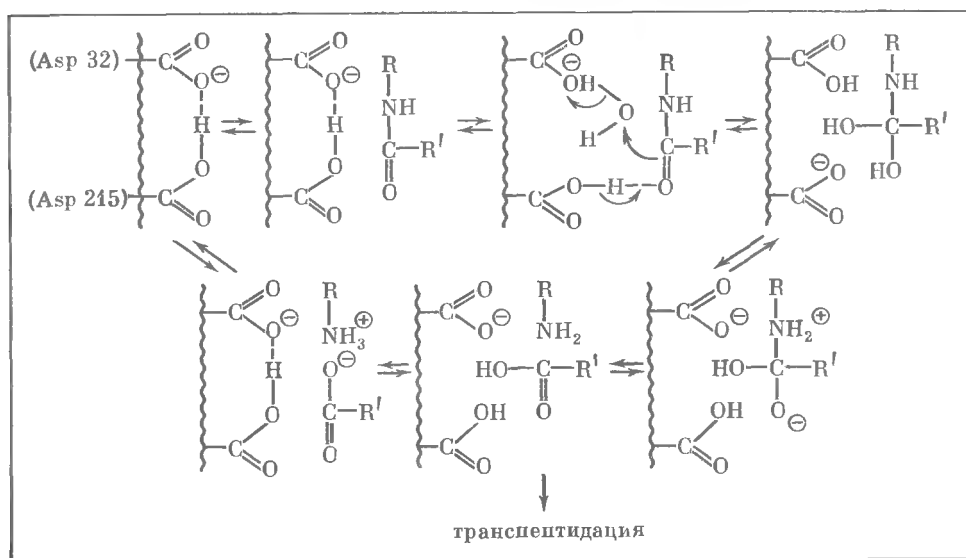


Рис.118. Схема механизма пепсинового катализа

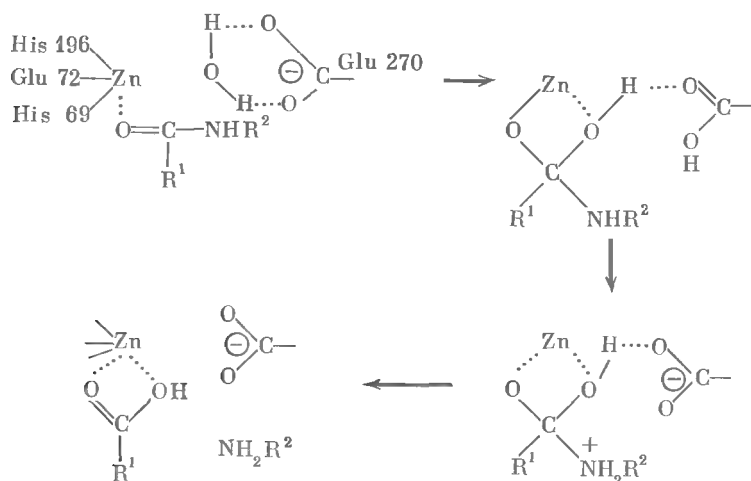
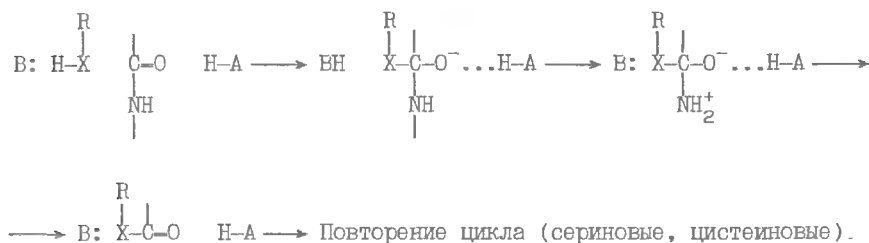


Рис.119. Схема механизма катализа карбоксипептидазой А

цистеиновые амидгидролазы, и функционирующие по типу общего катализа аспартазные и металлзависимые ферменты.

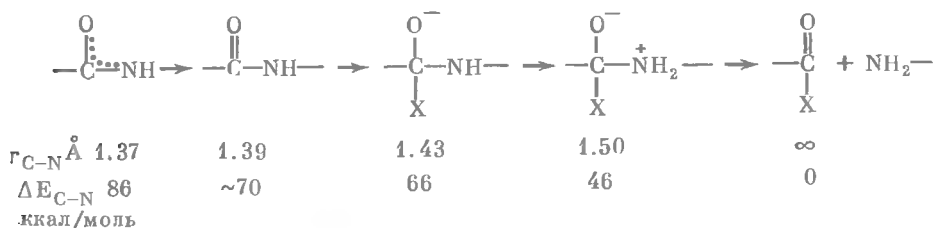
Несмотря на это различие в механизме катализа и строении каталитического аппарата всех до сих пор изученных амидгидролаз имеется много общего. В общем виде схема механизма гидролиза амидов и типы каталитических групп, свойственных представителям различных амидгидролаз, могут быть представлены следующим образом:



	B	R	X	AH
Сериновые	>N: (His57)	-CH ₂ (Ser195)	O	NH (Gly193, Ser195)
Цистеиновые	>N: (His159)	-CH ₂ (Cys25)	S	NH (Gln19, Cys25)
Аспартажные	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-O}^- \end{array}$ (Asp32 и Asp215)	H	O	H (?)
Металлзависимые	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-O}^- \end{array}$ (Glu270)	H	O	Zn ²⁺ .

Сходство между этими механизмами достаточно очевидно.

Попытаемся проанализировать важнейшие каталитические свойства амидгидролаз с точки зрения изложенных выше механизмов катализа. Наличие системы расположенных рядом нуклеофильных и электрофильных группировок обеспечивает возможность расщепления электронно-лабильных связей производных карбоновых кислот. Реакция гидролиза амидной связи – это ступенчатое понижение энергии C-N связи за счет поляризации:



Для осуществления такого процесса в физиологических условиях достаточно того набора нуклеофильных и электрофильных групп, который имеется в белках, в том числе амидгидролазах. Очевидно, что эти группы недостаточно активны для того, чтобы присоединяться к насыщенному атому углерода. Катализ реакций переноса насыщенных групп осуществляется в ферментах при посредстве кофакторов, таких, как, например, S-аденозилметионин (см. в: [1405]).

Вместе с тем в ряду производных карбоновых кислот специфичность (в терминах k_{cat}/K_m) ферментов разных типов по отношению к разным связям варьирует (см. разд.4.3.1.1).

Было показано [2009,3344], что различия в скоростях гидролиза эфиров и амидов у сериновых протеаз, достигающие четырех порядков, обусловлены исключительно различиями в стандартной свободной энергии их гидролиза, т.е.

объясняются различным состоянием расщепляемой связи в субстрате (рис.120). Энергетический уровень переходного состояния для эфиров и амидов практически одинаков. Это является демонстрацией справедливости в данном случае постулата Хеммонда [1531] о сходстве структуры основного и переходного состояний в экзотермических реакциях и указывают на определяющую роль основного состояния фермент-субстратного комплекса в реакциях, катализируемых сериновыми протеазами.

У аспартатных и металлзависимых протеаз соотношение скоростей гидролиза эфир-амид близко к единице. Это трактовалось [3342] как свидетельство преобладающей роли электрофильного катализа (т.е. протонирования карбонильного углерода и координации с металлом) у этих типов ферментов. Следует отметить, что и у цистеиновых протеаз соотношение $v_{\text{эфир}}/v_{\text{амид}} \approx 5$. Вклад электрофильного катализа в этом случае невелик. Возможно, что, по крайней мере в случаях аспартатных и цистеиновых протеаз, отсутствие заметных различий в скоростях гидролиза эфиров и амидов объясняется, если не полностью, то частично, меньшей разницей в свободных энергиях гидролиза этих субстратов при более кислых значениях pH (см. рис.28). Следует отметить, что существуют амидгидролазы, функционирующие в нейтральной среде и совсем не имеющие эстеразной активности. Различие в поведении эфирных и амидных субстратов карбоксипептидазы А может быть обусловлено различиями в характере определяющей скорость стадии многостадийного процесса гидролиза [3139].

Как показано на рис.120, переход от AcPheGlyNH_2 к AcPheAlaNH_2 , т.е. введение одной метильной группы, приводит к значительному снижению уровня энергии переходного состояния практически без изменения уровня энергии основного состояния. Иными словами, специфичность в этом случае проявляется в максимальной скорости гидролиза, а не в связывании. Такая ситуация харак-

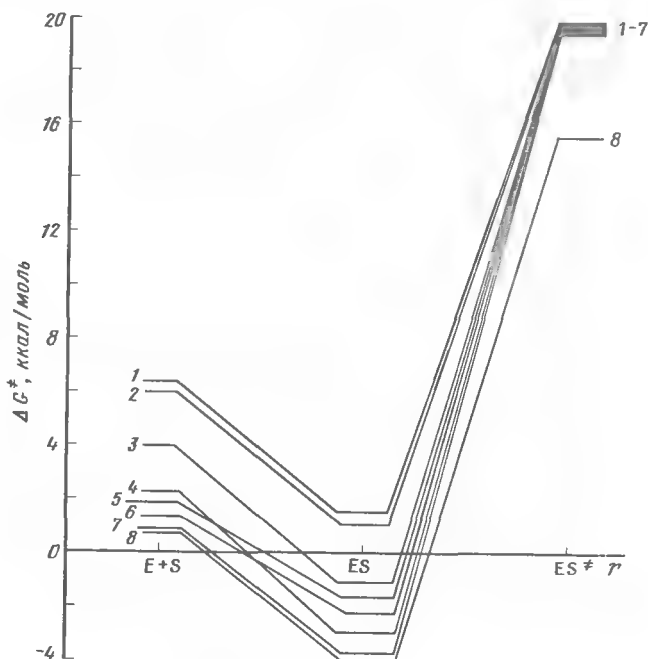


Рис.120. Изменение свободной энергии по координате реакции (r) при ацилировании химотрипсина субстратами типа $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X}$ [3344]

X: 1- OEt ; 2- OMe ;
3- $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{-}n$;
4- NHC_6H_5 ; 5- NH_2 ;
6- NHNH_2 ; 7- GlyNH_2 ;
8- AlaNH_2

терна для многих протеаз: особенно четко она проявляется для пепсина (см. разд.4.3.1.3.). Вторичные взаимодействия, по-видимому, играют решающую роль в образовании продуктивного комплекса, причем энергия этих взаимодействий используется для компенсации энергетически неблагоприятных изменений системы (конформационные изменения, дестабилизация расщепляемой группы и т.д.). Такая трактовка позволяет приблизиться к пониманию причин уникальной специфичности некоторых амидгидролаз. Среди представителей каждой группы ферментов имеются амидгидролазы с широкой специфичностью и такие, которые катализируют гидролиз одного или очень ограниченного числа однотипных субстратов. В качестве примера можно привести почечный ренин, действующий на ангиотензиноген и слабо гидролизующий некоторые аналоги N-концевого фрагмента этого субстрата. Не удалось обнаружить каких-либо других пептидов, эффективно гидролизующихся этим ферментом.

Даже в ряду менее специфичных амидгидролаз наблюдаются очень большие различия в скорости расщепления пептидов в зависимости от числа аминокислотных остатков в них (табл. 79). Обращает на себя внимание тот факт, что различия в активности обусловлены изменением k_{cat} , а не K_m , т.е. разные ферменты обладают практически одинаковым сродством к данному субстрату, но превращают его со скоростями, отличающимися на 4 порядка.

Таблица 79. Гидролиз пептида ZLeuValPhe(NO₂)AlaApm аспартатными протеазами [1715]

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_m \cdot 10^3$, М	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹	Относительная активность
Пепсин	43	0,3	$1,43 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^4$
Химозин	$1,16 \cdot 10^{-2}$	0,25	46,4	4,2
Катепсин D	$6,6 \cdot 10^{-3}$	0,6	11	1

У этих ферментов вторичные взаимодействия субстрата, по-видимому, в разной степени "индуцируют" изменения, приводящие к продуктивному комплексу. Можно ожидать, что конформационные изменения, индуцируемые при связывании одного и того же субстрата (или субстратоподобного ингибитора), будут менее выражены у более специфических ферментов. Однако сравнительные исследования такого рода не проводились.

Амидгидролазы рассмотренных типов отличаются еще одной важной характеристикой: pH-оптимумом каталитической активности (см. разд.5.2.3). Эти различия хорошо согласуются с различиями каталитического аппарата этих ферментов. Наличие у сериновых, цистеиновых и металлоэндопептидаз каталитически активного остатка гистидина, функционирующего как общее основание и общая кислота, ограничивает интервал pH состоянием ионизации имидазольной группы этого остатка. Характерно, что у цистеиновых ферментов, функционирующих при pH 5-6, значение pK_a имидазольной группы в ацилферменте снижено до 4-4,5. В свободном ферменте pK_a увеличивается до 8, что обеспечивает существование стабильной ионной пары $ImH^+ \dots S^-$ (см. разд.7.1).

Очевидно, что в кислой области pH эффективно функционировать в качестве нуклеофила могут только карбоксилат-ионы. Действительно, протеиназы, рабо-

такие в кислых средах, относятся к группе аспартатных протеиназ. Повышение pH, приводящее к ионизации обеих карбоксильных групп активного центра, лишает эти группы протондонорных свойств, необходимых для общего кислотного катализа.

Имеется по крайней мере один пример, когда сериновые протеазы функционируют в слабокислой среде: это сериновые карбоксипептидазы. В настоящее время очень мало известно о строении каталитического аппарата этих ферментов. Не исключено, что в качестве общей кислотно-основной группы у них функционирует карбоксильная группа, а не имидазольная, как у истинных сериновых амидгидролаз.

Отмечалась тенденция [2461] некоторых амидгидролаз выравнивать энергетические барьеры многостадийных реакций гидролиза, что, возможно, связано с компенсирующими изменениями конформации фермента по ходу катализа. Можно полагать, что это общее свойство ферментов рассматриваемой группы.

В отношении механизма действия амидгидролаз имеется больше нерешенных вопросов, чем установленных фактов. Данные, суммированные выше, относятся лишь к простейшим представителям каждой группы этих ферментов, но и здесь нельзя считать, что мы исчерпали возможности познания.

Табл.12 показывает, какое разнообразие амидгидролаз представляет природа. Экстраполяция наших знаний на все эти объекты вряд ли оправдана.

7.11. К вопросу об эволюции

химических механизмов амидгидролаз

Нет сомнения в том, что процесс протеолиза должен был происходить еще на самых ранних этапах химической эволюции. В этот период гидролиз пептидных связей мог катализироваться относительно простыми предшественниками протеолитических ферментов, вероятно, системами, использующими атомы тяжелых металлов. В настоящее время нам известны по крайней мере четыре типа весьма сходных механизмов гидролиза. Установить эволюционные отношения между ними весьма сложно. Во-первых, трудно установить иерархию механизмов, т.е. утверждать, что один механизм совершеннее другого. По-видимому, отсутствует существенная разница в эффективности катализа разными протеазами, если использовать в каждом случае "идеальный" субстрат. Во-вторых, сейчас еще мало данных о типах протеолитических ферментов у разных видов организмов, отличающихся длительностью своей истории. Можно лишь высказать некоторые соображения по поводу эволюционных взаимоотношений амидгидролаз. Так, до сих пор не обнаружены аспартатные протеазы у прокариот. Этот тип ферментов широко распространен у низших грибов, млекопитающих, рыб и других животных, а также встречается у некоторых цветковых (насекомоядных) растений. Можно полагать, что аспартатные протеазы возникли на более поздних этапах эволюции, но не потому, что этот тип катализа более совершенен, а потому, что он приспособлен к определенным условиям, с которыми не сталкивались примитивные организмы.

Растения преимущественно содержат цистеиновые ферменты. Последние также широко распространены в тканях животных, но встречаются у некоторых бактерий и даже у вирусов.

Сериновые протеазы встречаются как у прокариот, так и у эукариот. Проте-

азы насекомых, хотя еще и недостаточно изучены, но преимущественно относятся к сериновому типу. Не менее широко распространены и металлзависимые протеазы. Здесь мы находим и ферменты микробов, и ферменты, функционирующие в тканях мозга. Из общих соображений заманчиво отнести именно этот тип протеаз к эволюционно древнейшему. Сходство структуры активных центров металлзависимых и сериновых протеаз, с одной стороны, и металлзависимых и аспартатных – с другой, наводит на мысль о том, что металлзависимые протеазы могут быть общим эволюционным предшественником этих двух типов ферментов.

Сейчас можно лишь надеяться, что дальнейшие исследования амидгидролазов разных типов живых организмов позволят составить более полное представление об эволюции химических механизмов протеолиза. Эта проблема будет затронута ниже (разд.8.7) в связи с представлениями об "идеальном" ферменте.

7.12. Заключение

Химическое превращение субстратов амидгидролаз осуществляется при участии каталитически активных групп фермента, функционирующих как нуклеофильные, общие основные и общие кислотные катализаторы. Характерной особенностью катализа, по-видимому, является действие нуклеофильной группы на резонансно дестабилизированную связь в продуктивном фермент-субстратном комплексе. Элементарный акт химического изменения субстрата должен в этом случае проходить со скоростями, близкими к скоростям диффузионно контролируемых процессов. Гидролитическая реакция – многостадийный процесс, проходящий обычно через образование тетраэдрических промежуточных соединений, скорость образования и распада которых определяется структурой субстрата и, главным образом, свойствами уходящей группы.

По типу катализа амидгидролазы могут быть разделены на две большие группы – ферменты, функционирующие по типу ковалентного катализа, когда каталитическая группа фермента образует ковалентное промежуточное соединение с субстратом, и ферменты, функционирующие по типу общего основного катализа, когда группа фермента способствует отщеплению протона от молекулы воды, выступающей как нуклеофильный реагент. Несмотря на эти различия, в механизмах действия всех изученных амидгидролазов можно усмотреть много общего. Возможно, что эволюция химических механизмов амидгидролазов восходит к одному общему предшественнику.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ.

ТЕОРИИ И ГИПОТЕЗЫ

В настоящее время имеется множество теорий и гипотез, цель которых объяснить уникальные свойства ферментов – их специфичность и эффективность (см. обзоры: [9,1402,1613,2410,2450,2846,3345–3348]). Во многих случаях эти теории и гипотезы отличаются одна от другой лишь терминологией, так как основаны на одинаковой трактовке физической сущности рассматриваемых явлений.

Сравнивая каталитическое действие фермента на разные субстраты (специфичность) или сопоставляя его с модельной неферментативной реакцией (эффективность), оперируют каталитическими константами первого (k_{cat}) или второго (k_{cat}/K_m) порядка и константой скорости неферментативной реакции, которая может иметь псевдопервый или второй порядок. При сравнении с модельной системой обычно считают, что рассматриваемая модельная реакция протекает через те же промежуточные продукты, что и ферментативный процесс, т.е. является конгруэнтной.

Требования к модельной системе включают, помимо сходства структуры реагирующих групп, промежуточных соединений и идентичности продуктов реакции в сравниваемых системах, еще и близость значений pK_a , участвующих в процессе группировок [3349]. Все эти требования не всегда удается соблюсти, и отношение констант скоростей ферментативной и модельной реакций может заметно изменяться в зависимости от выбора модели.

Значения эффективности, конечно, зависят от выбора субстрата ферментативной реакции. Так, часто приводимая [2424,2453,3350] величина $1 \cdot 10^5$ (по k_{cat}/K_m) для химотрипсина, основанная на использовании в качестве субстратов амидов N-ацетиламинокислот, на пять порядков отличается от величины, получающейся при использовании одного из лучших пептидных субстратов (см. разд.4.4).

8.1. Общие сведения

Рассмотрим диаграмму изменения свободной энергии ферментативной и неферментативной реакций (рис.121)¹. Их основное различие заключается в том, что в ходе ферментативного катализа фермент и субстрат образуют комплекс, свободная энергия которого ниже, чем свободная энергия исходных реагентов. Если свободная энергия активации химической стадии остается одной и той же для обеих реакций, то увеличение скорости катализируемого процесса будет в точности пропорционально константе диссоциации фермент-субстратного комплекса. Это можно показать следующим образом. Рассмотрим два пути превращения субстрата – каталитический и некаталитический:

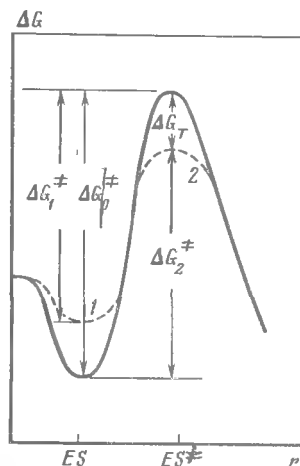
¹В качестве стандартного состояния здесь и далее используются изменения свободной энергии, отнесенные к 1 моль веществ при их концентрации 1М [3351].

В условиях, когда $[S]_0 \ll K_s$, $v_f/v_n = [E]_0/K_s$, а при $[S]_0 \gg K_s$, $v_f/v_n = [E]_0/[S]_0$, т.е. реакция не только не будет ускоряться, но и будет происходить медленнее, так как обычно $[E]_0 < [S]_0$.

Ясно, что образование фермент-субстратного комплекса само по себе без снижения энергии активации химического процесса не может обеспечить наблюдаемой эффективности ферментативного катализа.

Рис.122. Два способа понижения энергии активации: повышение энергии основного состояния (1) и понижение энергии переходного состояния (2)

Понижение свободной энергии активации ферментативной реакции по сравнению с конгруэнтной моделью можно, в принципе, реализовать двумя путями: или повысив свободную энергию основного состояния или понизив энергию переходного состояния (рис.122). В обоих случаях, используя выражение (2) и значения $\Delta G_{ES}^\ddagger$, ΔG_{ES} и $\Delta G_S^\ddagger$ из теории абсолютных скоростей реакций, можно показать, что различия в свободных энергиях активации двух процессов (ΔG_T) будет определяться выражением:



$$\Delta G_T = -RT \ln \frac{k_f}{k_n}, \quad \text{где } k_f = \frac{k_2}{K_s}.$$

Все существующие теории ферментативного катализа ставят своей целью объяснение причин различий в k_f и k_n , причем одни исходят из того, что это связано с изменением уровня свободной энергии основного состояния, а другие главную причину видят в понижении уровня свободной энергии (стабилизации) переходного состояния. Такая "классификация" существующих теорий и гипотез, конечно, в значительной степени условна, и четкую границу здесь не всегда можно провести, однако она удобна для изложения. Прежде чем перейти к изложению существующих концепций, необходимо познакомиться с факторами, которые могут вносить вклад в различие k_f и k_n .

8.2. Факторы катализа

Эффективность, т.е. отношение $k_{cat}/K_m k_n$, для амидгидролаз может достигать одиннадцати - двенадцати порядков (см. табл.50). Для некоторых других ферментов оценки эффективности дают значения 10^{16} - 10^{18} [3352, 3353]. Какие же факторы ферментативного катализа могут давать столь большие ускорения процесса?

8.2.1 Сближение и ориентация

В отличие от реакций в растворе реакции на ферменте происходят в ограниченном участке активного центра, где реагирующие группы сближены между собой.

Это приводит к увеличению локальной концентрации реагирующих групп, что эквивалентно уменьшению $\Delta G_{ES}^\ddagger$ (1).

Разные исследователи давали различную оценку вклада этого фактора. Так, исходя из тех соображений, что для молекул, соответствующих по размеру молекулам воды, максимальная концентрация составляет 55 М. Кошланд [1615] принимал эту величину как максимальную "эффективную концентрацию" при ферментативных реакциях. Такой концентрационный эффект соответствует изменению свободной энергии, равному 2,4 ккал/моль, или изменению энтропии на 8 э.е. При этом, естественно, не учитывается ориентационный эффект, который может достигать значительно больших величин. Так, исследования реакции диеновой конденсации [1616,1617] дают значения суммарной потери энтропии порядка -45 э.е. Эта величина складывается из значений, приведенных в табл.80.

Таблица 80. Изменения энтропии для различных типов движения

Тип движения		ΔS , э.е.
Поступательное движение (3 степени свободы)		29-36
Вращательное движение (3 степени свободы)*		5-6
Внутреннее вращение		3-5
Колебания с частотой (см^{-1})	1000	0,1
	400	1,0
	100	3,4
* На одну связь.		

О роли ориентации в катализе свидетельствуют также данные по внутримолекулярным реакциям (см. гл.3), когда наблюдаемые ускорения по сравнению с соответствующими межмолекулярными процессами достигают 10^6 - 10^7 .

Сходные величины эффектов сближения и ориентации получены [3354] теоретически на основе статистической термодинамики. Отношения констант скоростей внутри- (k_m) и межмолекулярной (k_b) реакций даются уравнением:

$$k_m/k_b = \frac{1}{N\delta V}, \quad (3)$$

где N - число Авогадро, а δV - элемент объема, в пределах которого находится центр масс реагирующих групп. Значения δV могут соответствовать сфере с диаметром, равным амплитуде колебаний образующей связи, т.е. $\approx 0,05 \text{ \AA}$, что даст отношение $k_m/k_b \approx 3 \cdot 10^7$.

Эффекты сближения и ориентации особенно значительны при высоких порядках реакций. Так, если два субстрата превращаются в продукт под действием трех катализаторов, то в растворе эта реакция имеет пятый порядок. На ферменте такой процесс может происходить в 10^{13} - 10^{17} раз быстрее [1615]. Была предложена довольно простая формула для оценки относительной скорости реакций в растворе и на ферменте, учитывающая ориентационные эффекты [1615]

$$\frac{v_f}{v_n} = \frac{[E]_0 (55,5)^{n-1} \Pi \theta}{\Pi [S] \Pi f_{xy} C}, \quad (4)$$

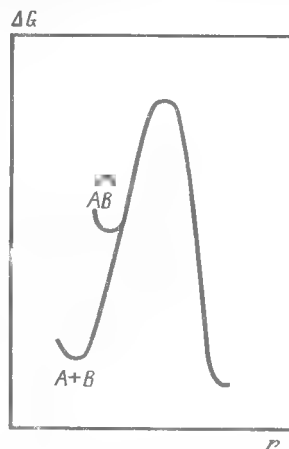
где θ - телесный угол контакта между соседними молекулами; f_{xy} - фактор коррекции для числа соседних молекул, окружающих каждую реагирующую молекулу.

Существенный вклад в эффективность ферментативного катализа может внести эффект "динамичного концентрирования" [3355,3356]. В растворе длительность существования молекулярной пары составляет около 10^{-11} с. Если такой комплекс не превращается в продукт, то он распадается, и система вновь переходит на низший уровень энергии. Длительность существования комплексов ферментов с субстратами, как показывают данные ЯМР [3357-3359], порядка 10^{-4} - 10^{-7} с, т.е. вероятность флуктуации, приводящей к активированному состоянию, существенно увеличивается. Этот эффект может увеличить скорость реакции на 6-9 порядков [3356].

Сходные идеи были развиты [3360,3361] в "пространственно-временной гипотезе", согласно которой фермент может удерживать реагирующие молекулы на критическом для взаимодействия расстоянии достаточно долгое для прохождения реакции время. Следует отметить, что в этих случаях недооцениваются значительные энтропийные затраты, необходимые для такого удерживания [3347].

Вклад концентрационного и ориентационного эффектов изменяет уровень свободной энергии основного состояния реакции (рис.123). Система как бы продвигается по координате реакции, и тем самым понижается активационный барьер. Этот эффект может иметь как энтропийный, так и энтальпийный характер.

Рис.123. Энергетический профиль реакции, демонстрирующий продвижение исходного состояния по координате реакции при образовании комплекса между реагирующими веществами



8.2.2. Орбитальный контроль

Исследование внутримолекулярных реакций лактонизации и тиолактонизации привело к мысли, что важное значение в катализе должно иметь точное соответствие ориентации орбиталей реагирующих атомов [3362-3365].

Как видно из рис.124, отклонение от идеального расположения реагирующих атомов (угол $\Delta\theta$) на 15° приводит к падению скорости лактонизации более чем на четыре порядка. Отсюда был сделан вывод, что подобные ускорения возможны и при ферментативном катализе, если в основном состоянии системы орбитали реагирующих атомов достаточно точно ориентированы.

Эта концепция подверглась серьезной критике [3366-3370] на следующих основаниях: 1) для объяснения относительных ускорений порядка 10^6 - 10^7 необходимо допустить, что точность ориентации реагирующих атомов должна составлять сотые доли градуса; 2) химическая связь нечувствительна к довольно

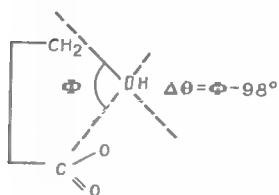
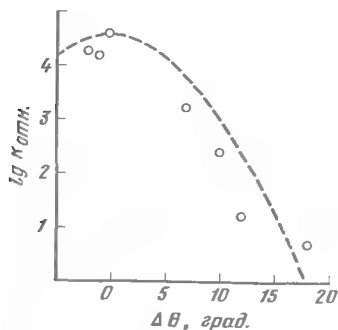


Рис.124. Зависимость относительной скорости лактонизации от степени отклонения от идеального расположения реагирующих атомов [3363]

большим угловым отклонениям (деформация связи C—C на 10° сопряжена с затратами энергии всего лишь 2,7 ккал/моль [1617]; 3) наблюдаемые различия в скоростях лактонизации обусловлены различием в "жесткости" молекул так, что у наиболее реакционноспособных соединений отсутствуют потери, связанные с замораживанием трансляционных и вращательных степеней свободы в основном состоянии.

8.2.3. Сольватационные эффекты

При образовании фермент-субстратного комплекса изменяется состояние сольватации реагирующей группы субстрата и каталитически активных групп фермента. Изменение сольватной оболочки сильно сказывается на нуклеофильной реакционной способности заряженных групп [1404,3371]. Реакция может происходить как если бы она осуществлялась в газовой фазе. На этом основании было высказано предположение [3372], что в активных центрах ферментов при связывании субстратов создаются условия, аналогичные газофазным. Это может сильно увеличить скорость реакции (см., например: [3373]).

В воде, где заряд может быть делокализован образованием водородных связей, анионы более стабильны, чем в апротонном растворителе. Поэтому в апротонной среде он будет значительно эффективнее присоединять протон или образовывать переходные состояния. Различия в свободных энергиях основных состояний ионов в воде и неводных растворителях могут привести к различиям в скорости реакции, достигающим 17 порядков [3374]. В ферментах изменения в сольватации вряд ли дают столь большие эффекты. Это связано с тем, что десольватация аниона хотя и увеличивает его нуклеофильность, но одновременно увеличивает и его основность. Поэтому соотношение нуклеофильности и основности практически не меняется [2353]. Кроме того, потеря сольватационной воды может компенсироваться переориентацией диполей групп белковой молекулы вблизи десольватированного заряда.

Неблагоприятное изменение свободной энергии при десольватации и появление заряда в апротонной среде частично компенсируется за счет увеличения трансляционных степеней свободы системы, так как при этом вытесняется несколько молекул воды.

Итак, сольватационные эффекты повышают уровень энергии основного состояния системы, продвигая ее по координате реакции в направлении переходного состояния. Это справедливо в том случае, если переходное состояние имеет меньший заряд, чем основное. Однако для многих гидролитических реакций пе-

переходное состояние оказывается более заряженным, чем основное, и реакция в апротонной среде будет происходить медленнее, чем в воде. Отсюда ясно значение механизмов компенсации заряда в переходном состоянии. Эффект среды вносит, по-видимому, отрицательный вклад в эффективность катализа гидролитическими ферментами, но он может компенсироваться "стабилизацией" зарядов при образовании переходного состояния [3352].

Существенное значение для каталитической эффективности ферментов может иметь состояние сольватации поверхности белковой глобулы даже в области, удаленной от активного центра [3375-3377].

Было показано, что связывание лигандов изменяет объем активации ($\Delta V^\ddagger$) химического превращения субстрата и что существует линейная корреляция между скоростью и объемом активации [3375]. Предполагается, что изменения конформации белка приводят как к изменению собственно объема белковой молекулы, так и к изменению степени экспонирования в раствор боковых цепей и амидных связей полипептидного остова. Это в свою очередь приведет к изменению состояния гидратационной оболочки белка, что может повысить энтропию системы. Если процессы перестройки гидратной оболочки происходят на лимитирующей скорости стадии процесса, то указанные явления приведут к изменению свободной энергии активации химического превращения субстрата. В этой связи уравнение для скорости химического процесса предложено [3375] представить в виде:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\frac{E^\ddagger}{RT}} e^{-\frac{P\Delta V^\ddagger}{RT}} e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}. \quad (5)$$

Таким образом, уменьшение объема активации при постоянном давлении приводит к экспоненциальному росту константы скорости.

Эти явления, по-видимому, играют важную роль в реакциях с положительным изменением энтропии активации [3377] и существенны для понимания неспецифического влияния ионов на каталитическую активность и температурную адаптацию ферментов у разных организмов [3376].

Было показано [3378], что имеется критическая степень гидратации белка для проявления им каталитической активности.

8.2.4. Электростатические эффекты

Эти эффекты тесно связаны с эффектами сольватации и уже частично обсуждались в предыдущем разделе. Здесь целесообразно обсудить собственно явление стабилизации заряда на ферменте и вклад этого явления в катализ [2939, 3379-3382]. Реакции, происходящие в водном растворе, практически нечувствительны к электростатической стабилизации заряда [3383], поскольку в средах с высокой диэлектрической проницаемостью энергия взаимодействия двух противоположно заряженных частиц очень невелика (для протона и электрона, находящихся на расстоянии 3,3 Å, $\Delta H = -1,3$ ккал/моль). Однако в аполлярной среде, как показали расчеты, проведенные для катализа лизоцимом [2939], стабилизация карбоний-иона (промежуточного продукта реакции) карбоксилат-ионом остатка Asp52 составляет 9 ккал/моль, а в сериновых протеазах стабилизация оксани-

она тетраэдрического промежуточного соединения – 30 ккал/моль [3381].

Необходимо отметить, что этот эффект обусловлен как непосредственным взаимодействием зарядов, так и взаимодействием между зарядом и перманентными и индуцированными диполями фермента [3380]. Представления о стабилизации переходного состояния за счет электростатических взаимодействий были развиты в ряде работ [3190, 3257, 3382], однако, если справедливы представления о возможности неадиабатического "туннельного" переноса протона (см. разд. 8.2.7), то само понятие заряда переходного состояния становится весьма неопределенным.

Существенным для белков-ферментов является микрогетерогенность в значениях диэлектрической проницаемости, что приводит к возможности взаимодействия заряда с водным окружением, а также предорганизация полярной среды – высоко полярные группы в белке фиксированы и не могут изменять свою ориентацию под действием внешнего поля. Заряд, появляющийся внутри белковой глобулы, например в ходе превращения субстрата, не может из-за фиксации диполей эффективно реорганизовать белковую "среду", однако внешняя среда (вода, окружающая глобулу) может достаточно сильно поляризоваться таким зарядом.

Расчеты показывают, что энергия реорганизации среды зарядом, экранированным белковой глобулой существенно меньше, чем зарядом, расположенном целиком в водной фазе. Это может быть существенным фактором снижения энергии активации (см. обзоры: [3384, 3385]).

8.2.5. Деформация субстрата

Всякое изменение длины связи или валентного угла в реагирующей группе субстрата приводит к ее дестабилизации и облегчает разрыв связи. В ходе химической реакции происходят существенные изменения этих параметров. Если активный центр фермента представляет собой жесткую "конструкцию", то возможна ситуация, когда связывание субстрата за счет взаимодействий с удаленными от реагирующей группы участками будет приводить к возникновению деформаций в самой реагирующей группе. Это приведет к продвижению системы в направлении переходного состояния. Если активный центр является конформационно подвижным, а субстрат – "жестким", то субстрат может индуцировать деформацию (скорее всего, энергетически неблагоприятные конформационные изменения) в ферменте. Эти представления лежат в основе многих современных теорий и гипотез ферментативного катализа, и они будут подробнее разобраны ниже. Здесь же укажем, что концепция деформации субстрата получила вначале экспериментальное подтверждение в работах по рентгеноструктурному анализу лизоцима и его комплексов с ингибиторами [3379, 3386]. Однако в дальнейшем [3387] было показано, что в каталитическом участке этого фермента (участок D) связывание сахарного остатка не сопряжено с затратами энергии. Это все же не означает отсутствия деформации, а может быть связано с компенсацией энергетических затрат другими энергетически благоприятными факторами.

Как было показано в разд. 6.5.2 и 7.3, связывание ингибиторов амидгидролазами также приводит к деформации потенциально гидролизуемой амидной связи за счет вращения вокруг связи C–N и пирамидализации амидной группы.

Еще одним примером дисторсионного механизма катализа является *цис-транс*-изомерия некоторых азокрасителей, которая практически не ускоряется низко-

молекулярными веществами, но заметно катализируется такими белками, как сы-вороточный альбумин [3388]. Спектральными методами показано, что в комплексе краситель-белок азогруппа искажена в направлении переходного состояния *цис-транс*-изомеризации.

Необычные спектральные характеристики многих металлосодержащих белков и их комплексов с лигандами показывают, что атом металла в них находится в особом деформированном (в отношении распределения электронной плотности) состоянии, которое было названо "энтатическим состоянием" [3389,3390]. Предполагается, что это состояние имеет важные преимущества в отношении каталитической эффективности.

Спектральными методами была установлена поляризация карбонильных групп субстратов в цитратсинтазе [3391,3392], дрожжевой альдолазе [3393] и триозофосфатизомеразе [3394].

Для разграничения терминов "деформация" (strain) и "напряжение" (stress) было предложено [1613, с.323] использовать термин "деформация" только для случаев физической деформации (изменение длин связей, валентных углов и т.д.), а термин "напряжение" – для состояний с повышенной по сравнению с нормальной свободной энергией. Причиной напряжений могут быть в том числе и сольватационные, и электростатические эффекты. Провести четкую границу между деформацией и напряжением не всегда возможно.

8.2.6. Полифункциональный катализ

Участие в катализе нескольких функциональных групп может внести очень большой вклад в эффективность процесса за счет факторов концентрирования и ориентации. Одновременное участие нескольких каталитических групп в составе одного фермента понижает порядок реакции по сравнению с реакцией в растворе, причем порядок реакции (n) и изменение энтропии активации процесса связаны соотношением [1578]:

$$-T\Delta S^\ddagger = n \cdot 4,5 \text{ ккал/моль.}$$

Поэтому участие в катализе ферментом уже двух групп и одного субстрата могло бы понизить энтропию активации по сравнению с соответствующим тримолекулярным процессом более чем на 13 ккал/моль. На самом деле такие ускорения не наблюдаются. Одна из возможных причин этого заключается в том, что образование переходного состояния из большого числа взаимодействующих атомов требует реализации синхронных колебаний, вероятность которых резко падает с увеличением числа атомов в системе (см. разд.3.4.8). Проблема существования в ходе ферментативных реакций согласованного общего основного и общего кислотного катализа остается пока окончательно не решенной (см.: [1404, с.171]).

8.2.7. Квантово-химические эффекты

Обычно в растворе и газовой фазе химические реакции подчиняются принципу Франка-Кондона, т.е. движение атомных ядер происходит значительно медленнее движения электронов, и при каждом расположении ядер электроны движутся так,

как будто ядра остаются неподвижными.

Для большинства простых реакций электронного переноса весьма вероятно адиабатическое протекание реакции, когда при координатах тяжелых ядер, близких к активационному барьеру, электронные орбитали обоих реагентов образуют единую систему и электрон в каждый данный момент обладает минимальной энергией. Однако если перенос электронов затруднен, то единый терм не образуется и электроны туннелируют. Типичное квантовое поведение характерно и для протона [1512, 3384, 3395]. Он ведет себя не как классическая частица (с частотой $\omega \ll kT/h \approx 1 \cdot 10^{-12} \text{ с}^{-1}$), а как квантовая частица (с $\omega \gg kT/h$). Это означает, что протон в определенных условиях способен к подбарьерному, туннельному переходу. Условием туннелирования является близость электронных термов атомов, между которыми происходит перенос протона (рис.125). Связи-

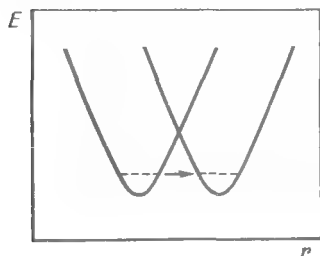


Рис.125. Перенос протона туннелированием при равенстве электронных термов атомов донора и акцептора

вание ферментом субстрата может приводить к реорганизации "среды" активного центра, т.е. к переориентации диполей, так что электронные уровни атомов, участвующих в переносе протона, будут выравниваться. Подбарьерный перенос протона будет при этом происходить существенно быстрее, чем соответствующий "классический" перенос. Это может увеличить эффективность катализа в тех случаях, когда перенос протона является лимитирующей скоростью стадий. Исследования температурной зависимости кинетического изотопного эффекта растворителя в реакциях, катализируемых химотрипсином и трипсином (см. разд. 5.5), согласуются с этими представлениями.

8.3. Теории и гипотезы.

Дестабилизация основного состояния

Теории и гипотезы ферментативного катализа, основанные на представлениях о "дестабилизации" основного состояния, наиболее многочисленны и восходят еще к представлениям о катализе, сформулированным Фишером. Термин "дестабилизация" здесь означает повышение свободной энергии основного состояния, обусловленное любыми причинами, о которых будет сказано ниже.

Следует подчеркнуть, что все модели, основанные на дестабилизации основного состояния, прямо или косвенно исходят из представления о том, что ферментативная и модельная реакции идут через одно и то же переходное состояние.

8.3.1. Непродуктивное связывание

Еще в 1892 г. Тамман [3396] отмечал различие между ферментативным гидролизом и гидролизом под действием кислот, заключавшееся в избирательности пер-

вого и неизбежности второго. Наиболее четко и обоснованно эти идеи были сформулированы Фишером [3397], предложившим известную концепцию "ключа и замка".

В соответствии с этой концепцией фермент имеет ограниченную область (называемую теперь активным центром) жесткой конфигурации, которая может связывать лишь субстрат, комплементарный ей по своей конфигурации (рис.126). Таким образом, фермент может связывать и превращать лишь вполне определенный субстрат или группу очень сходных веществ. Фактически эффективность фермента связывалась с комплексообразованием так, как это обсуждалось с разд.8.1.

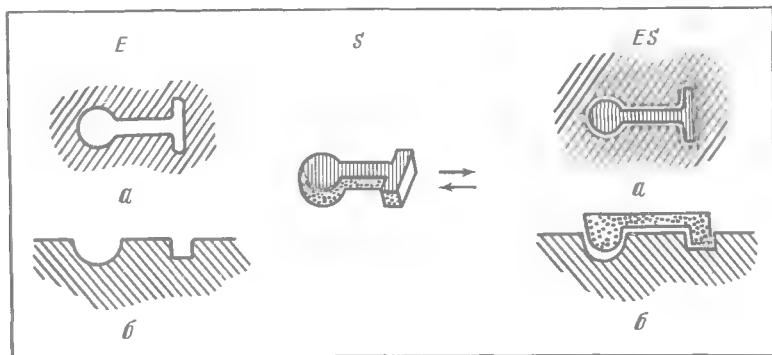
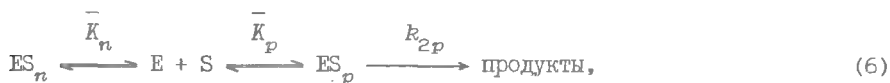


Рис.126. Иллюстрация концепции "ключ-замок"
а- вид "сверху"; б- вид "сбоку"

Представления Фишера были затем развиты Бергманом и Фрутоном в их теории множественного сродства [3398] и в дальнейшем – Отстоном [3399]. Эти идеи известны под названием теории трехточечного связывания и позволили объяснить стереоспецифичность ферментов.

В 1950-х годах сложились представления о непродуктивном связывании [1717,3400–3402]. Они заключаются в том, что скорость ферментативной реакции зависит от того, насколько "правильно" связывается субстрат в активном центре. "Плохой" субстрат может эффективнее связываться "неправильно", затрудняя образование продуктивного фермент-субстратного комплекса:



где $\bar{K}_p$ – константа ассоциации продуктивного комплекса (ES_p), а $\bar{K}_n$ – константа ассоциации непродуктивного комплекса (ES_n).

Эти представления были развиты Хейном и Ниманом в их "четырёхзубой" (tetradental) модели специфичности химотрипсина [1718,3403,3404].

Согласно этой модели, фермент имеет четыре тетраэдрически расположенных локуса: ρ_1 , ρ_2 , ρ_3 и ρ_H , комплементарных замещающим группам субстрата в L-конфигурации (рис.127).

Локусы фермента ρ_1 , ρ_2 и ρ_3 акцептируют соответственно группы $NHCO^R$, боковую цепь и расщепляемую связь субстрата, а локус ρ_H имеет "негативную

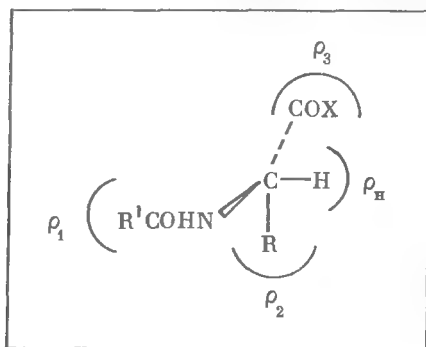


Рис.127. "четырёхзубая" модель взаимодействия субстрата в *L*-конфигурации с активным центром химотрипсина

специфичность", т.е. не может связывать группы более объёмные, чем протон.

В такой модели возможны 16 взаимодействий, приводящие к 12 комплексам. Из них продуктивными являются те, у которых реализуется правильное взаимодей-

ствие с локусами ρ_3 и ρ_H . Относительная стабильность комплексов зависит от индивидуальных *R*- ρ -взаимодействий, причем важнейшее положение теории заключается в постулировании аддитивности всех взаимодействий.

Скорость ферментативной реакции в модели Хейна-Нимана описывается выражением (см. схему 6):

$$v = \frac{\sum_p \frac{k_{2p} \bar{K}_p}{\bar{K}_o} [E]_o [S]_o}{1/\bar{K}_o + [S]_o}, \quad (7)$$

где k_{2p} — константа химического превращения продуктивного комплекса ES_p ; $\bar{K}_p$ — константа ассоциации продуктивного комплекса; $\bar{K}_o = \sum_n \bar{K}_n + \sum_p \bar{K}_p$ — сумма констант ассоциации непродуктивных и продуктивных комплексов. Для каждого комплекса константа ассоциации в силу аддитивности равна произведению индивидуальных микроскопических констант *R*- ρ -взаимодействий:

$$\bar{K}_\alpha = \prod_{ij} k_{ij}. \quad (8)$$

Микроскопические константы вследствие симметричности модели могут быть записаны в виде матрицы

$$\begin{vmatrix} k_{11} & k_{12} & k_{13} & k_{1H} \\ k_{21} & k_{22} & k_{23} & k_{2H} \\ k_{31} & k_{32} & k_{33} & k_{3H} \\ k_{H1} & k_{H2} & k_{H3} & k_{HH} \end{vmatrix} = \bar{K}_{o(L)} \bar{K}_{o(D)}, \quad (9)$$

где индексы 1, 2, 3 и H относятся к взаимодействиям R_1 , R_2 , R_3 и H с ρ_1 , ρ_2 , ρ_3 и ρ_H . В алгебраической форме этой матрицы положительные члены соответствуют константам ассоциации *L*-изомера субстрата, а отрицательные — константам ассоциации *D*-изомера. Микроскопические константы (табл.81) подбираются эмпирически и методом последовательных приближений добиваются выполнения условия (9). Этим методом были рассчитаны константы ассоциации не-

Таблица 81. Микроскопические константы связывания соединений типа $R_1R_2CHR_3$ [3403]*

Заместитель	i	$k_{i,j}$			
		$j=3$	$j=2$	$j=1$	$j=H$
H	H	0,826	0,826	0,826	0,826
CONH ₂	3	0,0371	0,007	0,037	0,479
C ₆ H ₅ CH ₂	2	1,22	72,9	0,84	0,282
<i>n</i> -HOC ₆ H ₄ CH ₂	2	1,08	63,3	0,649	0,301
3-IndCH ₂	2	60,8	340,2	24,6	0,136
CH ₃ CONH	1	3,67	0,727	0,788	0,400
α -C ₅ H ₅ NCONH	1	3,97	0,795	1,59	0,333
ClCH ₂ CONH	1	5,9	12,7	0,731	0,350
CF ₃ CONH	1	1,9	1,0	1,3	0,400
C ₂ H ₅ OOCCONH	1	1,38	1,37	5,28	0,300

*Условия: pH 7,9; 25°C; 0,1н. NaCl.

которых амидов N-ациламинокислот с химотрипсином.

Из формулы (7) следует, что каталитическая константа

$$k_{\text{cat}} = \frac{\sum_p \bar{k}_{2p} \bar{K}_p}{\sum_n \bar{K}_n + \sum_p \bar{K}_p} \quad (10)$$

В простейшем случае, если имеются лишь один продуктивный и один непродуктивный комплексы, выражение для k_{cat} будет:

$$k_{\text{cat}} = \frac{\bar{k}_{2p} \bar{K}_p}{\bar{K}_n + \bar{K}_p} = \frac{\bar{k}_{2p}}{\frac{\bar{K}_n}{\bar{K}_p} + 1} \quad (11)$$

Таким образом, когда превалирует продуктивное связывание ($\bar{K}_p \gg \bar{K}_n$), наблюдаемая каталитическая константа становится равной константе химического превращения продуктивного комплекса $k_{\text{cat}} = \bar{k}_{2p}$.

Непродуктивные комплексы снижают эту величину на множитель $\bar{K}_p / \bar{K}_n + \bar{K}_p$.

Легко показать, что $\bar{K}_n$ вносит вклад в свободную энергию основного состояния:

$$\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger} = (\Delta G_{2p}^{\ddagger} + \Delta G_p) - \Delta G_n \quad (12)$$

Из формулы (12) видно, что продуктивное связывание как бы "дестабилизи-

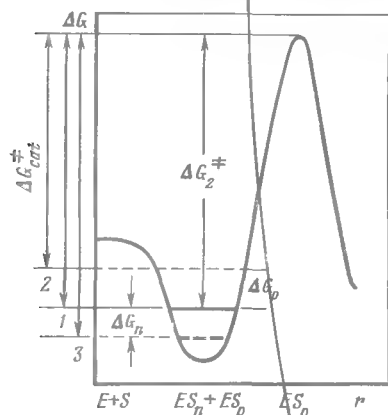


Рис. 128. Энергетический профиль ферментативной реакции, демонстрирующий роль непродуктивного связывания

$$1 - \Delta G_p = \Delta G_n, \quad \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_2^{\ddagger};$$

$$2 - \Delta G_p \gg \Delta G_n, \quad \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_2^{\ddagger} + (-\Delta G_p);$$

$$3 - \Delta G_p \ll \Delta G_n, \quad \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_2^{\ddagger} - (-\Delta G_p)$$

рует", основное состояние реакции (ΔG_p и ΔG_n — отрицательные величины), что иллюстрируется рис. 128.

Предсказание значений k_{cat} в теории Хейна и Нимана возможно, если правильно выб-

рать значение k_{2p} и определить величины $\bar{K}_p$ и $\bar{K}_n$, используя значения микроскопических констант. Предполагается, что k_{2p} значительно выше константы скорости соответствующей неферментативной реакции, хотя теория не объясняет причин этих различий.

Следует подчеркнуть, что эта теория может быть использована лишь для ограниченного числа субстратов. Она не учитывает роли вторичных взаимодействий, а значения микроскопических констант определяются тем набором субстратов, который в данном случае используется. При увеличении числа экспериментальных данных эти значения могут существенно измениться.

Кроме того, как и все модели непродуктивного связывания, модель Хейна и Нимана не объясняет различий в константе скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) для разных субстратов.

В соответствии с уравнением (7), для $p=1$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = k_{2p} \frac{\bar{K}_p}{K_p}, \quad (13)$$

т.е. константа скорости второго порядка не зависит от степени непродуктивного связывания.

Представления о непродуктивном связывании применимы и для объяснения различий в скоростях гидролиза промежуточных ацилферментов [1328, 3405]. Известно, что ацилхимотрипсины, образованные D-аминокислотами, очень медленно подвергаются гидролизу, причем чем более специфичной является аминокислота, тем медленнее идет ее расщепление. По-видимому, в D-ациламиноацилхимотрипсинах ацильный остаток расположен преимущественно неправильно, но лучшие объяснения этим данным дают представления о напряжении или индуцированном соответствии (см. ниже).

8.3.2. Теория напряжений

Из схемы 1 (см. разд. 8.1) можно записать, что

$$\frac{\bar{K}_{ES} K_{ES}^{\ddagger}}{K_{ES} K_{ES}^{\ddagger}} = 1 \quad \text{и} \quad \frac{\bar{K}_T K_{ES}^{\ddagger}}{K_{ES} K_S^{\ddagger}} = \quad (14)$$

где $\bar{K}_{ES}$ и K_T — константы ассоциации фермента с субстратом и "переходным состоянием" соответственно, а $K_{ES}^\ddagger$ и $K_S^\ddagger$ — константы равновесия образования активированных комплексов в катализируемой и некатализируемой реакциях, причем в соответствии с теорией абсолютных скоростей реакций

$$k = \frac{kT}{h} K^\ddagger, \quad (15)$$

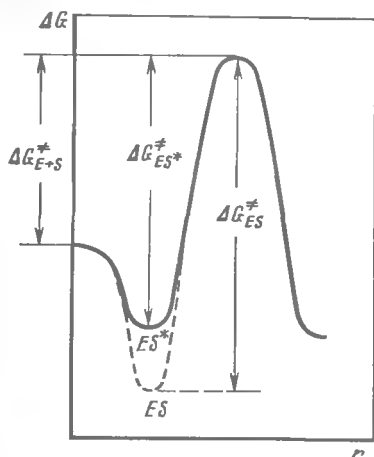
отсюда

$$\frac{\bar{K}_T}{\bar{K}_{ES}} = \frac{k_f}{k_n}. \quad (16)$$

Это означает, что катализ возможен лишь в том случае ($k_f \gg k_n$), если переходное состояние эффективнее связано с ферментом, чем основное состояние реагирующей системы (т.е. $\bar{K}_T \gg \bar{K}_{ES}$).

Эти соображения привели Холдена [1744, с.182], а затем Полинга [2843] к идее о том, что активный центр фермента структурно комплементарен не субстрату в его основном состоянии, а переходному состоянию реагирующих ве-

Рис.129. Энергетический профиль ферментативной реакции, демонстрирующий роль напряжения или деформации в основном состоянии



ществ. Таким образом, фермент, связывая субстрат, создает в нем напряжение или деформацию (рис.129). Гипотетический фермент-субстратный комплекс, в котором отсутствуют напряжения (ES), имеет существенно более низкую свободную энергию, чем напряженный комплекс (ES^*). Выигрыш в энергии активации соответствует энергии напряжения, т.е. энергия напряжения расходуется на дестабилизацию основного состояния, и вследствие этого активационный барьер понижается.

Теория напряжений претерпела определенную эволюцию от постулирования геометрических деформаций субстрата (теория "дыбы") [1375,2449] до трактовки напряжений как следствия десольватационных, электростатических и энтропийных эффектов [9,1404].

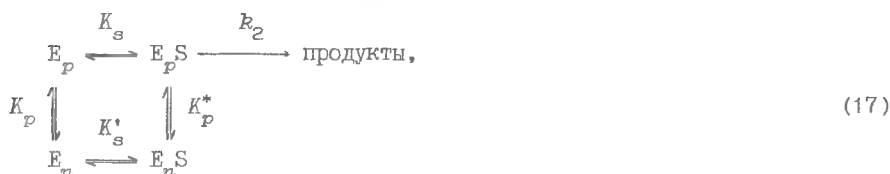
Важно подчеркнуть, что все эти эффекты в теории напряжений проявляются в основном состоянии. Дальнейшее развитие теории привело к убеждению, что они имеют большее значение для переходного состояния, чем для основного (см. разд.8.4).

Аргументы в пользу реальности напряжений и деформаций в фермент-субстратных комплексах уже приводились в разд.8.2.5. Теория напряжений согласуется со многими экспериментальными данными, хотя и сталкивается с определенными трудностями. Напряжение вызывает изменение в уровне свободной энергии основного состояния, т.е. в одинаковой степени увеличивает как K_m , так и k_{cat} . Таким образом, величина k_{cat}/K_m , характеризующая специфичность фермента, не должна изменяться. Это видно из рис.129, где высота активационного барьера по отношению к исходному состоянию свободного фермента и свободного субстрата не зависит от напряжения в основном состоянии фермент-субстратного комплекса. Это не согласуется с экспериментальными данными в отношении кинетики гидролиза, катализируемого многими протеазами. В большинстве случаев изменение длины пептидного субстрата не сказывается на величине K_m , но изменяет k_{cat} и соответственно k_{cat}/K_m (см. разд.4.3.1.3).

8.3.3. Индуцированное соответствие

Если в теории напряжения энергия связывания субстрата с ферментом расходуется на деформацию субстрата, то в теории индуцированного соответствия эта энергия расходуется на изменение фермента [3019,3352,3406]. Предполагается, что хороший субстрат эффективно изменяет конформацию фермента в направлении энергетически невыгодной, но каталитически более активной структуры. Разные субстраты вызывают различный "конформационный ответ" фермента, чем и определяется их способность к превращению.

Кинетическую схему такого процесса можно записать в виде:



где E_p - каталитически активная форма фермента; E_n - его неактивная форма; $K_p = [E_p]/[E_n]$ и $K_p^* = [E_p S]/[E_n S]$. Таким образом, между двумя формами фермента существует равновесие, сдвинутое в сторону неактивной формы (E_n), поскольку она является энергетически предпочтительной ($K_p \ll 1$), а субстрат изменяет это равновесие в пользу комплекса с активным ферментом так, что $K_p^* \gg K_p$.

Скорость превращения субстрата описывается уравнением

$$v = \frac{k_2 K_p^*}{1 + K_p^*} \frac{[E_0][S_0]}{K_p(1 + K_p^*) + [S_0]} \quad (18)$$

(учитывая условие $K_p \ll 1$).

Отсюда следует, что наблюдаемая константа скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) будет

Рис.130. Влияние индуцированного соответствия на свободную энергию основного и переходного состояний ферментативной реакции

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{k_2 K_p}{K_s}, \quad (19)$$

т.е. эта константа, а следовательно, и специфичность фермента не зависят от структуры субстрата, поскольку величина K_p характеризует равновесие между двумя формами свободного фермента.

Как видно из рис.130, чем выше разница в энергии двух состояний свободного фермента (чем меньше K_p), тем выше K_m и тем меньше k_{cat}/K_m . Если же весь фермент находится в активной конформации, то выражение для K_m в знаменателе формулы (18) будет:

$$K_m = K_s \frac{K_p^*}{1 + K_p^*}, \quad (20)$$

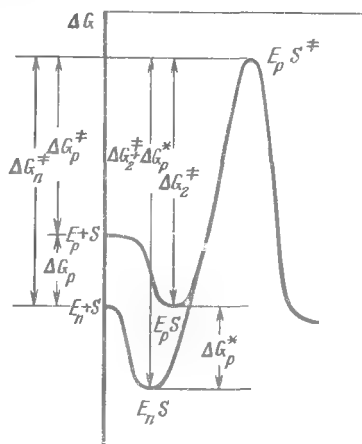
а $k_{\text{cat}}/K_m = k_2/K_s$, т.е. приобретает то же значение, что и в отсутствие индуцированного соответствия.

Хотя теория индуцированного соответствия в общем случае не решает проблем эффективности и специфичности катализа, были проанализированы случаи, когда специфичность может быть связана с индуцированными субстратом конформационными изменениями [3407]. Нет сомнения в том, что явление индуцирования субстратом конформационных изменений в ферменте существует. Эти изменения могут играть положительную роль в катализе, увеличивая ориентационные факторы, изменяя сольватацию или вызывая деформации субстрата. Заслугой теории является то, что она впервые привлекла внимание к важной роли конформационных изменений фермента в катализе.

Кроме того, представление об индуцированном соответствии хорошо применимо для объяснения аллостерии. В модели Кошланда-Немети-Филмера [3408] субъединичный белок в отсутствие лигандов существует в одной конформации, а при связывании лиганда последний индуцирует конформационные изменения, передающиеся на другую субъединицу. Эта модель хорошо объясняет особенности связывания кислорода гемоглобином.

8.4. Стабилизация переходного состояния

Как мы убедились, ни одна из рассмотренных выше теорий не объясняет понижения активационного барьера ферментативной реакции (k_{cat}/K_m) по отношению к барьеру неферментативного процесса, если считать, что обе реакции идут через одно и то же переходное состояние. Рассмотренные механизмы лишь изменяют уровень основного состояния ферментативной реакции. Очевидно, что к



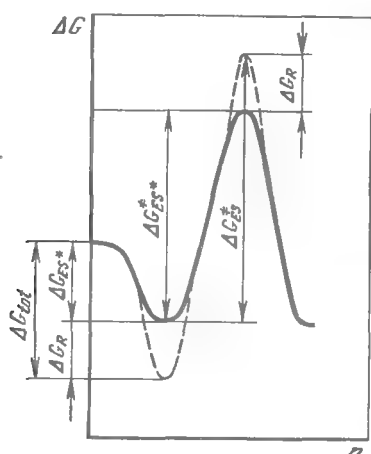


Рис. 131. Энергетический профиль реакции при условии комплементарности фермента переходному состоянию субстрата

каль объяснения эффективности и специфичности ферментов необходимо на пути, рассматривающем переходные состояния ферментативной и неферментативной реакций как различные.

Представим себе [1613], что субстрат, связываясь с ферментом, реализует лишь часть возможных взаимодействий вследствие того, что фермент некомплементарен основному состоянию субстрата (см. разд. 8.2). Комплементарность достигается лишь в переходном состоянии, и при этом субстрат реализу-

ет еще не использованные возможности связи с ферментом.

При этом, как видно из рис. 131, уровень свободной энергии основного состояния увеличивается по сравнению с уровнем полной комплементарности на некоторую величину ΔG_R , а уровень свободной энергии переходного состояния уменьшается на ту же величину.

Чтобы оценить эффективность катализа, обратимся вновь к схеме 1. В рассматриваемом случае величины ΔG_{ES} и $\Delta G_{ES}^{\ddagger}$ ($\Delta G_{ES}'$ и $\Delta G_{ES}^{\ddagger'}$) можно представить так:

$$\Delta G_{ES}' = \Delta G_{tot} - \Delta G_R \quad \text{и} \quad (21)$$

$$\Delta G_{ES}^{\ddagger'} = \Delta G_{ES}^{\ddagger} - \Delta G_R, \quad (22)$$

где ΔG_{tot} — полная энергия фермент-субстратного взаимодействия. В соответствии с равенством (2) можно записать, что:

$$\Delta G_{ES}^{\ddagger'} - \Delta G_{ES}' = \Delta G_S^{\ddagger} - \Delta G_T. \quad (23)$$

Подставляя сюда выражения (21) и (22) и учитывая, что по-прежнему $\Delta G_{ES}^{\ddagger} = \Delta G_S^{\ddagger}$, получим:

$$\Delta G_T^{\ddagger} = \Delta G_{tot}. \quad (23)$$

Таким образом, понижение энергии переходного состояния ферментативной реакции по сравнению с конгруэнтной модельной реакцией будет равно полной энергии фермент-субстратного взаимодействия. Оценки этой энергии для производных ациламино кислот (см. разд. 6.6) дают значения, достигающие до 25 ккал/моль. Это с избытком покрывает все наблюдаемые различия в скоростях ферментативного и неферментативного гидролиза.

Такой механизм в отличие от рассмотренных выше объясняет изменение константы скорости второго порядка как в ряду субстратов (специфичность), так и по отношению к конгруэнтной модели (эффективность).

Этот же результат можно получить из теории напряжений, если предположить, что напряжения, возникающие в основном состоянии, снимаются по достижении системой переходного состояния.

Концепция стабилизации переходного состояния подкрепляется следующими аргументами: 1) оценки полной энергии фермент-субстратного взаимодействия обычно значительно превышают наблюдаемые (в K_s) изменения свободной энергии комплексообразования; 2) имеется много примеров, когда в серии субстратов изменяется каталитическая константа при практически постоянном значении K_s (см. разд.4.3.4). Наиболее характерным примером может служить катализируемый пепсином гидролиз пептидов, когда при переходе от ди- к тетрапептидам K_m (равная в данном случае K_s) изменяется не более, чем в 10 раз, а k_{cat} увеличивается в 10^5 раз; 3) направленный мутагенез групп, участвующих в связывании субстрата, часто влияет не на связывание (K_s), а на катализ (k_{cat}). Особенно подробно такие работы проведены на примере тирозил-тРНК синтетазы [1613,3409-3411]; 4) так называемые аналоги переходного состояния (см. разд.5.9.7) имеют, как правило, аномально низкие значения K_t . Однако, как уже указывалось, трактовка этого факта не является однозначной.

Применительно к катализу химотрипсином и некоторыми другими протеазами эти идеи были воплощены в виде экстракционно-конформационной модели их действия (см. обзор: [1963]).

Экспериментальный факт, лежащий в основе этой модели, заключается в том, что для субстратов химотрипсина - эфиров *N*-ациламинокислот изменение свободной энергии на стадиях ацилирования ($\Delta G_2^\ddagger$) и деацилирования ($\Delta G_3^\ddagger$) фермента соответствует изменению свободной энергии при переносе боковой цепи субстрата из воды в неполярное окружение (ΔG_{ex}^R):

$$\Delta G_2^\ddagger = \Delta G_3^\ddagger \approx \Delta G_{ex}^R. \quad (24)$$

В то же время в бимолекулярном процессе из исходных реагентов (k_{cat}/K_m) наблюдается соотношение:

$$\Delta G_3^\ddagger \approx 2\Delta G_{ex}^R. \quad (25)$$

Это последнее соотношение показывает, что энергия гидрофобного взаимодействия используется как для образования комплекса фермента с субстратом, так и для понижения активационного барьера химической стадии, что и предсказывает теория стабилизации переходного состояния.

Объяснение этого эффекта заключается в том, что в переходном состоянии вследствие конформационных изменений возникают дополнительные гидрофобные взаимодействия, отсутствовавшие в основном состоянии фермент-субстратного комплекса (рис.132) [3350,3412].

Кроме гидрофобных взаимодействий в стабилизации переходного состояния могут участвовать все те взаимодействия, о которых говорилось в разд.8.2, если только их эффективность в основном и переходном состояниях различается.

В качестве иллюстрации таких взаимодействий можно указать на гидрохимотрипсинотрипептиды AcPheGlyuH₂ и AcPheAlaH₂ [41]. Как же объяснить, что замена ароматического бокового радикала на алифатическую группу

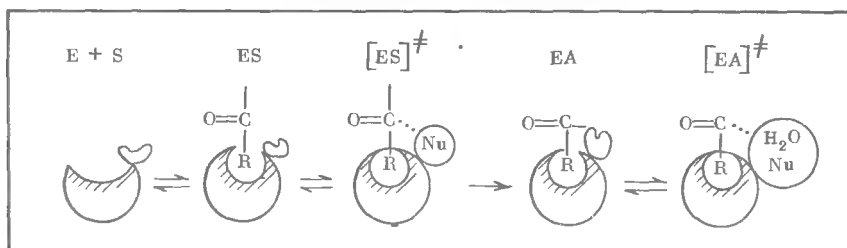


Рис.132. Механизм возникновения дополнительных гидрофобных взаимодействий фермента с субстратом при образовании переходного состояния [3350, с.157]

Ala) приводит к резкому увеличению скорости гидролиза, проявляющемуся в k_{cat} , а не в K_m . Анализ рентгеноструктурных моделей фермента показал, что в основном состоянии комплекса химотрипсина с аланиновым субстратом имеются неблагоприятные взаимодействия метильной группы с некоторыми группами белка, а при образовании тетраэдрического промежуточного соединения эти взаимодействия отсутствуют. Этот результат можно трактовать как в рамках представлений о стабилизации переходного состояния, так и в рамках теории напряжений, включающей стабилизацию переходного состояния как результат снятия напряжений основного состояния.

Предполагается, что в стабилизации переходного состояния у сериновых протеаз основной вклад вносят водородные связи. Оценка энергии этого вклада дана в работе [3413]. Предложены два механизма такой стабилизации: один [1330] предполагает участие трех Н-связей, образуемых переходным состоянием и отсутствующих в комплексе Михаэлиса. Это связи, образуемые карбонильным О-атомом с NH-группами Ser195 и Gly193, и связь ациламиногруппы субстрата с карбонилем Ser214. Электростатическое поле, создаваемое ионной парой Asp102-His57, возможно стабилизирует тетраэдрическое переходное состояние у сериновых протеаз [3190, 3257]. Другой механизм [2011, 3414] предполагает наличие этих связей как в комплексе Михаэлиса, так и в переходном состоянии, и эти связи не вносят вклада в энтальпию активации реакции, однако существенно изменяют энтропию переходного состояния. Были получены экспериментальные подтверждения этого второго механизма [3415].

Теория стабилизации переходного состояния наиболее полно согласуется с экспериментальными данными, но и она встречается с серьезными трудностями.

Наиболее существенная из них следующая: стабилизация переходного состояния требует, чтобы в этом состоянии возникали новые взаимодействия между ферментом и субстратом, отсутствовавшие в основном состоянии фермент-субстратного комплекса. Это означает, что образование переходного состояния должно сопровождаться или конформационными изменениями фермента [1963] или, по крайней мере, переориентацией ряда групп фермента. Однако образование переходного состояния, т.е. элементарный акт реакции, — флуктуация, происходящая за 10^{-12} – 10^{-13} с [3416]. За это время соударяющиеся частицы не успевают обменяться энергией, и полная энергия атомов остается неизменной на протяжении элементарного акта. Очевидно, что конформационные изменения белка, происходящие со скоростями порядка 10^6 – 10^4 с $^{-1}$, никак не могут совершаться в течение элементарного акта.

Можно предположить, что ответственные за стабилизацию переходного состояния группы как бы "осциллируют" между двумя состояниями, и если элементарный акт происходит в момент благоприятного для стабилизации переходного состояния положения групп, то переходное состояние стабилизируется. Но и в этом случае несогласование временных интервалов процессов делает, по моему мнению, вероятность стабилизации весьма малой.

Влияние факторов синхронизации на скорость процесса можно оценить по формулам, приведенным в разд.3.4.8. Для образования трех водородных связей необходимо синхронное движение не менее шести тяжелых атомов, что резко снизит скорость процесса даже при энергии активации $E_{\text{синх}}^{\#} \approx kT$.

Далее, стабилизация переходного состояния фактически предусматривает использование энергии дестабилизации основного состояния (или энергии напряжения). Иначе говоря, выигрыш энергии и ее расходование происходят на разных стадиях процесса. Это требует формулирования каких-то механизмов "запасания" энергии в ходе каталитического акта.

Такой механизм был предложен в работах [3417,3418], в которых белковая молекула рассматривалась как твердое тело, неоднородное по "плотности". Наименьшая "плотность" приписывалась области активного центра. В этой модели энергия сорбции субстрата запасается глобулой белка в виде упругих деформаций и "стекает" в область активного центра бездиссипативным путем в виде большого числа когерентных по частоте и фазе фононов. Вопрос о правомерности моделирования белка упругим твердым телом остается открытым.

Наконец, трудно объяснить в рамках этой модели постоянство величин K_s в сериях субстратов, сильно отличающихся по числу возможных контактов с ферментом (например, субстраты пепсина). Почему практически постоянная часть полной энергии взаимодействия реализуется в наблюдаемых значениях K_s ? Кажется, логичнее предположить, что чем больше полная энергия взаимодействия субстрата с ферментом в основном состоянии, тем меньшая часть должна использоваться на стадии переходного состояния. Собственно, такой механизм и наблюдается для эфиров ациламинокислот - субстратов химотрипсина, где как K_s , так и k_{cat} пропорциональны гидрофобности боковой цепи. Однако, у пептидных субстратов этого не наблюдается.

8.5. Фермент - "машина"

В работах [2450,3419-3422] была проанализирована применимость теории активированного комплекса к реакциям с участием биополимеров. Был сформулирован вывод, в соответствии с которым теория активированного комплекса и ее эмпирические предшественники (уравнения Аррениуса и Вант-Гоффа) неприменимы к таким реакциям и, возможно, даже неприменимы к реакциям в конденсированной фазе. Это обусловлено, главным образом, тем, что любая тепловая флуктуация приводит к изменению структуры "среды" - фермента, его "конструкции". Следствием этого является возникновение кинетической неравновесности в ходе процесса, и тогда бессмысленно говорить о комплементарности и существовании активационного барьера. Изменение последнего связано с конформационными и конфигурационными превращениями макромолекулы, а собственно химическое превращение с ростом числа богатых энергией молекул, т.е. с явлением, не связанным с состоянием макромолекулы. Макромолекула фермента - фактически

своеобразная машина, в которой пространственно совмещены механические и статистические компоненты. Такая машина обладает выделенными степенями свободы и способна использовать внутреннюю энергию для совершения полезной работы.

Эти соображения позволили предложить *релаксационную концепцию ферментативного катализа*, согласно которой конформационные изменения фермент-субстратного комплекса, индуцированные присоединением субстрата, носят характер релаксации и сопровождаются химическим превращением молекулы субстрата.

В соответствии с этой гипотезой присоединение субстрата вызывает локальные, очень быстрые (за времена колебательной релаксации 10^{-12} – 10^{-13} с) изменения в геометрии и электронной структуре активного центра. При этом субстрат и его окружение оказываются в новом равновесном состоянии, тогда как вся глобула продолжает оставаться в прежнем состоянии. Это ведет к возникновению стерических напряжений. Релаксация всей макромолекулы к новому состоянию происходит за времена порядка миллисекунд, и именно на данной стадии происходит каталитическое превращение субстрата.

Эта концепция не противоречит некоторым экспериментальным данным, касающимся процессов переноса электрона (см., например: [3423]), хотя она вряд ли применима для объяснения эффективности и специфичности гидролитических ферментов. В частности, в соответствии с релаксационной гипотезой вблизи положения равновесия константы скорости релаксационных стадий должны уменьшаться. Вместе с тем данные по скоростям изотопного обмена в состоянии равновесия для реакций, катализируемых пепсином [1732] и химотрипсином [1731], не согласуются с этим предсказанием.

Скорость превращения ES в EP измерялась в реакциях, катализируемых пируваткиназой [3424] в стационарных условиях и условиях равновесия. Были получены одинаковые значения. По мнению авторов [3424], фермент увеличивает популяцию колебательно-возбужденных состояний фермент-субстратного комплекса, не изменяя потенциальной поверхности реакции.

Остаются неясными движущие силы химического превращения. Обычно связь субстрата с ферментом достаточно слаба, тогда как разрыв химической связи требует больших энергетических затрат. Наконец, гидролитические реакции начинаются не с разрыва связи, а с ее образования (атака атома кислорода на карбонильный углерод). Релаксационную концепцию, по-моему, трудно применить к таким процессам.

Представление о наличии у ферментов выделенных "конструктивных" (механических) степеней свободы разрабатывалось также и другими исследователями [3417, 3425]. Механизм работы фермента трактовался в них как следствие конформационной неравновесности фермента и фермент-субстратного комплекса, возникающей после осуществления первого акта превращения субстрата и сохраняющейся без диссипации энергии до следующего акта катализа.

4.3. Квантово-химическое описание ферментативных реакций

Квантово-химическая теория окислительно-восстановительных реакций [3426] была распространена [3427] на реакции, протекающие с разрывом химических связей, и в дальнейшем — на ферментативные процессы [3384, 3395, 3428–3432].

Основы этих представлений лежит мысль о том, что в ферментативных реакциях

чается во флуктуационном изменении ориентации диполей макромолекулы белка и не сопровождается растяжением связи. Реорганизация среды активного центра приводит к перераспределению электронных уровней реагирующих атомов, причем переходному состоянию будут соответствовать примерно одинаковые электронные уровни. В этом состоянии возможен подбарьерный (туннельный) перенос протона.

Таким образом, вероятность элементарного акта реакции зависит от конформационного состояния среды и электронного состояния активного центра фермента:

$$w = \sum_{\substack{\alpha, \alpha' \\ n, n'}} \Phi_{\alpha, n} w_{\alpha, \alpha'}^{n, n'}, \quad (26)$$

где $\Phi_{\alpha, n}$ – вероятность того, что до реакции среда характеризуется конформационным состоянием α и электронным состоянием n , а $w_{\alpha, \alpha'}^{n, n'}$ – вероятность перехода системы в состояния α' и n' . Общий результат электронно-конформационных взаимодействий заключается в том, что электронная перестройка в ходе реакции влечет за собой изменение конформации макромолекулы. Трактовка этих явлений на языке теории твердого тела привела [3433] к введению представления о существовании квазичастицы "конформона" (по аналогии с поляроном), включающей электрон и деформацию макромолекулы, энергия которой меньше, чем энергия свободного электрона. Вследствие этого понижается и барьер реакции.

Эти представления согласуются с так называемым принципом компенсации (дополнительности) [1375], согласно которому изменение конформационной энергии по координате реакции является дополнительным к изменениям химической свободной энергии, вследствие чего суммарное изменение оказывается "сглаженным".

Детальное описание этих представлений с привлечением математического аппарата квантовой механики выходит за рамки наших задач и содержится в цитированных выше работах.

8.7. "Идеальный" фермент

Изложенное выше показывает, что каталитическое действие фермента может быть, в принципе, обусловлено сродством фермента к субстрату на разных стадиях процесса. Учитывая сродство продукта реакции к ферменту, можно различить [3348, 3434] три типа фермент-субстратных взаимодействий (рис. 133) – *униформное* связывание, когда фермент не дискриминирует субстрат, переходное состояние и продукт и связывает все эти формы практически одинаково, *дифференциальное* связывание, когда фермент различным образом связывает субстрат и продукт, и *связывание (катализ) элементарных стадий*, когда фермент связывает переходное состояние более прочно, чем субстрат и продукт. В первом случае оптимальный катализ будет наблюдаться при равенстве активационных барьеров переходного состояния и диссоциации комплекса фермент-продукт ($a=b$). Во втором случае каталитическая эффективность оказывается максимальной при равенстве уровней свободной энергии комплексов ES и EP, т.е. когда равновесие между "внутренними" комплексами близко к единице. Наконец, "иде-

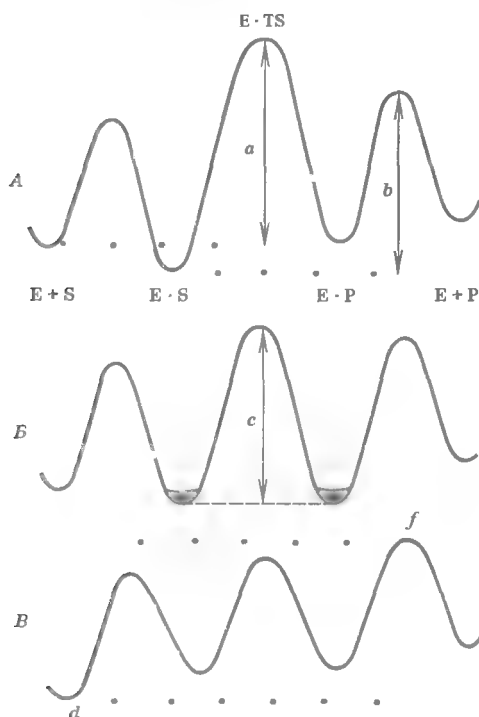


Рис.133. Иллюстрация трех типов изменений свободной энергии по координате реакции при ферментативном катализе [3348]
 А - равномерное связывание, Б - дифференциальное связывание, В - связывание (катализ) элементарных стадий (см. текст)

альный" фермент с наименьшими энергетическими барьерами будет в случае, когда стабилизируется переходное состояние. Следует подчеркнуть, что термодинамический анализ этих случаев справедлив, если в качестве стандартного состояния выбраны реальные концентрации субстрата, существующие *in vivo*. По-видимому, существуют ферменты, отвечающие каждому из перечисленных типов связывания [3348]. Примером "идеального" фермента может служить β -лактамаза [3435]. Количественный анализ этих случаев и условия равенства свободных энергий "внутренних" стадий дан в работе [3436].

8.8. Основное состояние элементарного акта ферментативной и модельной реакций

Ферментативный процесс - многостадийная реакция, реализующаяся посредством серии последовательных элементарных актов. Каждый акт в той или иной степени изменяет состояние субстрата, и поэтому основное состояние лишь самого первого элементарного акта идентично основному состоянию в модельной конгуэнтной системе. Сравнение активационных барьеров последующих элементарных стадий с активационными барьерами неферментативной реакции возможно лишь при

Рассмотренные выше теории и гипотезы прямо или косвенно игнорируют это обстоятельство. Так, трудности, возникающие при попытках объяснения эффективности и специфичности ферментов дестабилизацией основного состояния фермент-субстратного комплекса, возникают в основном в силу того, что барьер химической стадии в отсутствие дестабилизации признается равным барьеру химической стадии неферментативного процесса. Это понятно, так как исключая какой-либо фактор, влияющий на скорость реакции, мы тем самым считаем, что в отсутствие этого фактора скорости сравниваемых процессов должны быть одинаковы. Далее, сравнивая скорости превращения дестабилизированного на ферменте субстрата с неферментативной реакцией, в качестве основного состояния для последней выбирают состояние субстрата в отсутствие каких-либо дестабилизирующих факторов. Таким образом, сопоставляются два элементарных акта, имеющих различные основные состояния. Очевидно, что для того, чтобы оценить понижение активационного барьера элементарного акта химической стадии (и любой другой), нужно выбирать одинаковые основные состояния реагирующих веществ.

Это можно формализовать следующим образом. Если на ферменте субстрат находится в состоянии S_a , то можно себе представить, что в растворе имеется некоторая доля молекул, находящихся в том же состоянии, т.е. существует равновесие



Формы S_n и S_a могут обладать совершенно разной реакционной способностью. Для простоты можно полагать, что реакция происходит только с молекулами активной формы (S_a) с константой скорости k_a . Тогда наблюдаемая скорость превращения всего субстрата будет:

$$v_n = k_a K_n [S]_0. \quad (28)$$

Следовательно, выбор одинакового основного состояния означает, что при сравнении активационных барьеров ферментативной и неферментативной реакций должны сравниваться константа k_a для неферментативного процесса и константа скорости соответствующей стадии каталитической реакции.

3.9. Фермент не понижает энергию активации элементарного акта химической реакции

Предлагаемая в этом разделе концепция сформулирована автором совместно с М.Я.Карпейским и Г.И.Яковлевым [3437]. Она использует многие идеи, изложенные выше, и развивает представления, высказанные в работах [1715, 3438]. Основные положения этой концепции заключаются в следующем: а) фермент не понижает свободную энергию активации элементарного акта химического превращения субстрата, если в качестве основного состояния выбираются идентичные для катализируемой и некатализируемой реакций состояния субстрата; б) фермент стабилизирует термодинамически невыгодное в растворе, но реакционно-способное состояние субстрата, образуя с ним продуктивный фермент-субстрат-

ный комплекс; 6) образование продуктивного фермент-субстратного комплекса происходит ступенчато, так что на каждой стадии процесса фермент комплементарен структуре субстрата. Каждая стадия протекает в оптимальных условиях, создающихся в результате завершения предыдущей стадии (см.: [3438]).

8.9.1. Описание модели

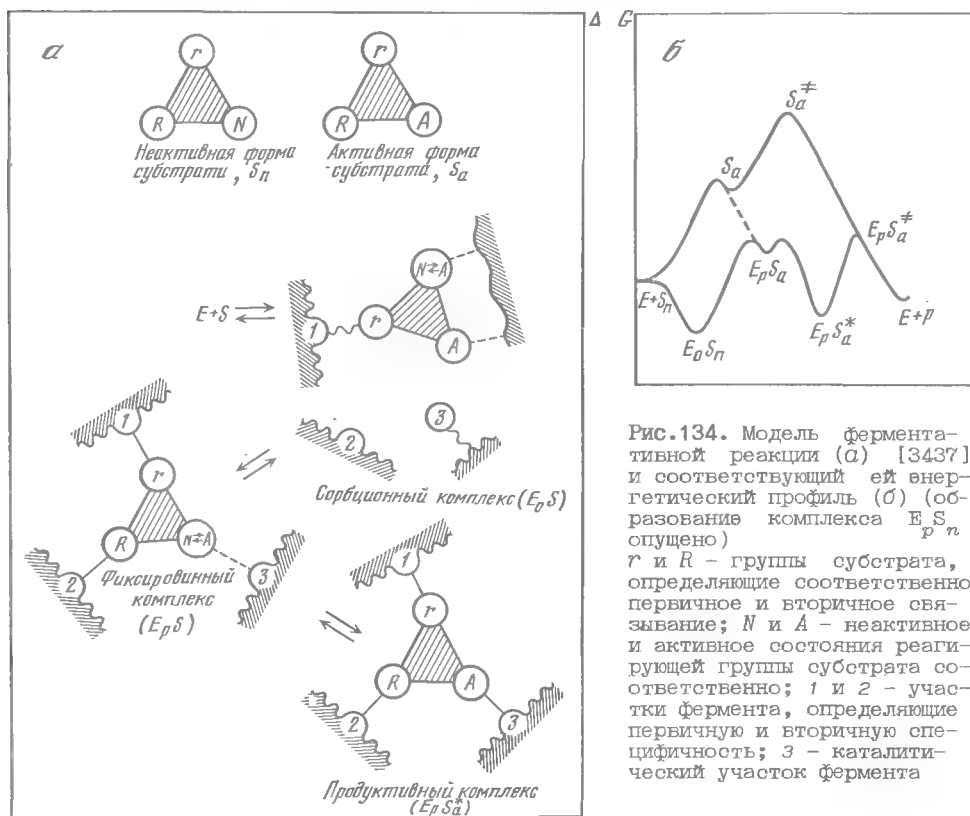
Рассмотрим подробнее процесс фермент-субстратного взаимодействия (рис.134). Как уже отмечалось в предыдущем разделе, для субстрата в растворе всегда можно найти состояние, максимально близкое по структуре и распределению электронной плотности к состоянию, которое он имеет в продуктивном фермент-субстратном комплексе. Это состояние (S_a) находится в равновесии с "неактивной" формой (S_n), причем равновесие смещено в сторону последней ($K_n \ll 1$). Особенности этого состояния применительно к реакциям, катализируемым амид-гидролазами, обсуждаются в разд.8.10.

На первой стадии каталитического процесса обе формы субстрата способны связываться с ферментом, давая неспецифический сорбционный комплекс ($E_c S_n$ и $E_c S_a$), причем константы ассоциации обеих форм субстрата с ферментом практически одинаковы. Этот комплекс образуется за счет столкновения молекулы субстрата с активным центром фермента, и система теряет при этом трансляционные степени свободы. Однако вращение вокруг одинарных связей фрагментов молекулы субстрата и функциональных групп активного центра фермента остается незаторможенным, т.е. субстрат может быть ориентирован относительно белка различным образом. Уменьшение энтропии вследствие комплексообразования может компенсироваться вытеснением молекул воды, составляющих гидратную оболочку взаимодействующих с белком фрагментов субстрата и молекул, иммобилизованных в активном центре фермента.

Строение сорбционного комплекса характеризуется подвижностью его компонентов, т.е. в нем осуществляются не все потенциально возможные контакты между субстратом и ферментом. При образовании этого комплекса реализуется первый уровень специфичности фермента (первичная специфичность).

На второй стадии происходит фиксация сорбционного комплекса в конформации, обеспечивающей возможность взаимодействия реагирующего фрагмента молекулы субстрата с группами активного центра фермента. Образуются так называемые фиксированные комплексы $E_p S_n$ и $E_p S_a$. При этом реализуется максимально возможное число взаимодействий между нетрансформируемыми фрагментами молекулы субстрата и белком, обусловленные топохимическим соответствием реагентов. На этой стадии проявляется вторичная специфичность ферментов. На этой стадии проявляется вторичная специфичность ферментов.

Для простоты изложения можно принять, что вклад в свободную энергию фиксированного комплекса, обусловленный взаимодействием *реагирующего фрагмента* молекулы субстрата с белком, равен нулю. Следовательно, здесь еще не происходит стабилизации активной формы субстрата. Это происходит на следующей стадии образования продуктивного комплекса ($E_p S_a^*$). Стабилизация активной формы субстрата может происходить как за счет образования новых связей *реагирующего* фрагмента с группами белка, так и благодаря топохимическому соответствию этого фрагмента *активной формы* субстрата активному центру белка. Смысл стабилизации активной формы заключается в способности фермента диск-



минимизировать состояние реагирующего фрагмента активной и неактивной форм субстрата и образовывать с первой более прочный комплекс. Таким образом, фермент на стадии образования продуктивного комплекса комплементарен основному состоянию активной формы субстрата.

Следует подчеркнуть, что такое рассмотрение является в значительной степени условным, и продуктивный фермент-субстратный комплекс может образовываться из комплекса с неактивной формой ($E_p S_n$) путем изомеризации последнего ($E_p S_n \rightarrow E_p S_a^*$). В общем случае различие в строении и свойствах реагирующего фрагмента молекулы субстрата в его разных формах обусловлено особенностью строения всей молекулы. Изомеризация $E_p S_n \rightarrow E_p S_a^*$ происходит потому, что топохимическое соответствие между неактивной формой субстрата и ферментом достаточно только для образования комплекса $E_p S_n$, тогда как условием образования $E_p S_a^*$ является трансформация $S_n \rightarrow S_a$.

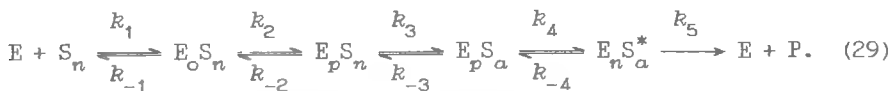
8.9.2. Кинетическое рассмотрение модели

Как уже было показано в предыдущем разделе, превращению субстрата в растворе можно представить как



Тогда $v = k_n K_n [S]_0$ или $v = k_n [S]_0$, где $k_n = k_n K_n$ — наблюдаемая константа скорости ферментативной реакции.

Ферментативная реакция происходит в соответствии с предлагаемой моделью по схеме:



Поскольку стабилизация формы S_a ферментом происходит только на стадии k_4 , равновесие между комплексами $E_p S_n$ и $E_p S_a$ не зависит от фермента, и поэтому $k_3/k_{-3} = K_n$. Существует, конечно, и параллельный путь, начинающийся с взаимодействия свободного фермента с активной формой субстрата и приводящий к комплексу $E_p S_a$, однако, так как $[S_a] \ll [S_n]$, этот путь можно не рассматривать.

При условии, что все равновесия устанавливаются быстрее, чем происходит химическое превращение субстрата, скорость ферментативной реакции можно представить формулой:

$$v = \frac{k_5 K_p K_n K_Q [E]_0 [S]_0}{K_s + [1 + K_p (1 + K_n K_Q)] + [S]_0}, \quad (30)$$

$$\text{где } K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}, K_p = \frac{k_2}{k_{-2}} \text{ и } K_Q = \frac{k_4}{k_{-4}}.$$

Экспериментально определяемые кинетические параметры будут:

$$k_{cat} = \frac{k_5 K_p K_n K_Q [E]_0 [S]_0}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)}, \quad (31)$$

$$K'_m = \frac{K_s}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)}, \quad (32)$$

$$\frac{k_{cat}}{K'_m} = \frac{k_5 K_p K_n K_Q}{K_s}. \quad (33)$$

В том случае, если химическая стадия не лимитирует общую скорость процесса, выражение для скорости реакции имеет довольно сложный вид и неудобно для анализа. Однако из него следует, что k_{cat} принимает значение константы скорости одной (наиболее медленной) стадии или является комбинацией констант скорости нескольких стадий, а K'_m становится равной K_s .

Эффективность ферментативного катализа может быть выражена как отношение k_{cat}/k_n или как отношение $k_{cat}/K'_m k_n$. Из формул (31) и (33) и значения $k_n = k_n K_n$ (учитывая, что $k_n = k_5$) имеем:

$$\frac{k_{cat}}{k_n} = \frac{K_p K_Q}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)},$$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{k_n K'_m} = \frac{K_p K_Q}{K_s} \quad (35)$$

В разд.8.10 мы попытаемся оценить значения K_n и K_Q . Значение K_p может в принципе быть больше или меньше единицы в зависимости от того, достаточен ли вклад вторичных взаимодействий, чтобы превысить потери, связанные с замораживанием вращательных степеней свободы. При $K_p \gg 1$ и $K_n K_Q < 1$ $k_{\text{cat}}/k_n = K_Q$, а если $K_n K_Q > 1$, то $k_{\text{cat}}/k_n = 1/K_n$. В то же время если $K_p \ll 1$, то k_{cat}/k_n будет равно соответственно $K_p K_Q$ или $1/K_n$.

Специфичность, т.е. отношение кинетических констант в серии субстратов, обычно оценивают по отношению констант скорости второго порядка (k_{cat}/K'_m). В серии однотипных субстратов скорость гидролиза в растворе практически не зависит от типа субстрата, т.е. для всех веществ серии должны быть одинаковыми значения k_a , k_s и K_n . Отсюда следует, что отношение констант скорости второго порядка для двух субстратов должно быть:

$$\frac{(k_{\text{cat}}/K'_m)_1}{(k_{\text{cat}}/K'_m)_2} = \frac{K_p^{(1)} K_Q^{(1)} K_s^{(2)}}{K_p^{(2)} K_Q^{(2)} K_s^{(1)}} \quad (36)$$

Относительные величины k_{cat} и K'_m зависят от значений констант K_p и $K_n K_Q$ (табл.82).

Из табл.82 видно, что возможны три случая: а) когда специфичность проявляется только в K'_m (1 и 3); б) когда специфичность проявляется как в k_{cat} , так и в K'_m (2 и 4); в этих случаях может соблюдаться принцип "лучшее связывание - лучший катализ" [1962]; в) если участки первичной специфичности у ряда субстратов одинаковые или очень сходные, то $K_s^{(1)} \approx K_s^{(2)}$. При этом специфичность будет проявляться только в значении каталитических констант (k_{cat}), а величины K'_m будут для всех субстратов практически одинаковыми (случай 4).

Таблица 82. Отношение кинетических констант двух субстратов

Номер п/п	Условия			Значение	
	K_p	$K_n K_Q$	$K_p K_n K_Q$	$k_{\text{cat}}^{(1)}/k_{\text{cat}}^{(2)}$	$K'_m^{(1)}/K'_m^{(2)}$
1	$\gg 1$	$\gg 1$	—	1	$\frac{K_s^{(1)} K_p^{(2)} K_Q^{(2)}}{K_s^{(2)} K_p^{(1)} K_Q^{(1)}}$
2	$\gg 1$	$\ll 1$	—	$K_Q^{(1)}/K_Q^{(2)}$	$\frac{K_s^{(1)} K_p^{(2)}}{K_s^{(2)} K_p^{(1)}}$
3	$\ll 1$		$\gg 1$	1	Как (1)
4	$\ll 1$	—	$\ll 1$	$\frac{K_p^{(1)} K_Q^{(1)}}{K_p^{(2)} K_Q^{(2)}}$	$\frac{K_s^{(1)}}{K_s^{(2)}}$

Вклад в катализ могут вносить все те эффекты, о которых говорилось в разд.8.2, если их проявление в основном состоянии стабилизирует *активную* форму субстрата в комплексе с ферментом.

Дополнительным источником ускорения могут быть факторы, проявляющиеся на стадии собственно химического превращения, такие, как общий катализ, полифункциональность катализа и т. п.

8.10. Пути к общей теории протеолиза

Изложенная в предыдущем разделе концепция вместе с конкретными сведениями о химии активных центров ферментов может стать хорошей основой для построения общей теории ферментативного гидролиза производных карбоновых кислот. Такая теория должна: а) с единых позиций объяснять каталитическую эффективность амидгидролаз; исходя из знания структуры субстрата и фермента, предсказывать величину каталитического ускорения реакции; б) объяснять различные проявления специфичности ферментов как в ряду субстратов, так и у разных амидгидролаз; в) объяснять регуляторные особенности ферментов. Пока ни одна из существующих моделей не в состоянии удовлетворить всем этим требованиям.

Рассмотрим с этой точки зрения предложенную выше модель. Здесь необходимо в первую очередь ответить на вопрос: что представляет собой постулируемая моделью *активная* форма субстрата применительно к субстратам амидгидролаз?

Основной причиной низкой реакционной способности амидов в гидролитических реакциях является резонансная стабилизация амидной группы. Нарушение π - π -сопряжения приводит к резкому возрастанию реакционной способности, что видно, например, из сравнения скоростей гидролиза амидов и бициклических β -лактамов (типа пенициллинов).

Анализ немногочисленных рентгеноструктурных данных показывает, что в фермент-субстратных комплексах вполне возможны искажения структуры амидной группы за счет, главным образом, ее пирамидализации. Это приводит к нарушению резонансной стабилизации амида, изменению порядков связей C-N и C=O и увеличению положительного заряда на карбонильном углероде.

Таким образом, вполне вероятно, что именно это состояние деформированной (пирамидализованной) амидной связи и является той *активной* формой субстрата, которая стабилизируется в продуктивном фермент-субстратном комплексе. В растворе эта форма термодинамически невыгодна. Как видно из рис. 2б, при степени пирамидализации $\Delta_C \approx 0,2 \text{ \AA}$ изменение энтальпии составляет около 20 ккал/моль, что не выходит за рамки общего изменения энергии при фермент-субстратном взаимодействии. Следует также учитывать возможность некоторого увеличения энтропии при этом процессе вследствие увеличения степеней свободы внутреннего вращения, а также возможность стабилизации пирамидализованной структуры за счет гидратации увеличивающихся в этом процессе зарядов. Я полагаю, что близкая к реальности оценка изменения свободной энергии при указанной степени пирамидализации в растворе составляет +15 ккал/моль. Отсюда оценка величины K_n [в формуле (34)] составит около $7 \cdot 10^{-10}$.

Конечно, не каждый субстрат, образуя продуктивный комплекс, реализует степень пирамидализации порядка $0,2 \text{ \AA}$. То же относится и к субстрату, обра-

зующему комплекс с разными ферментами. Задача заключается в том, чтобы установить степень оптимального нарушения резонансной стабилизации для разных фермент-субстратных комплексов.

Попробуем оценить другие параметры, определяющие эффективность катализа в нашей модели. Значение K_s легко определяется из данных стационарной кинетики, если справедливо равенство $K'_m = K_s$. В рамках модели это условие реализуется, когда $K_p < 1$ и $K_m K_q < 1$, т.е. равновесие сдвинуто в сторону сорбционного, а не фиксированного комплекса. Равенство K'_m для серии однотипных субстратов отражает, вероятно, то обстоятельство, что при образовании сорбционного комплекса с ферментом взаимодействует один и тот же одинаковый или очень сходный фрагмент субстрата. До тех пор пока в этой серии значение K_p не превысит единицу, специфичность будет проявляться лишь в максимальных скоростях. После этого должна наблюдаться тенденция к "насыщению" кинетической специфичности ($k_{cat} \approx \text{const}$) и будет проявляться специфичность по связыванию. Эти выводы находят экспериментальное подтверждение в анализе зависимостей k_{cat} от K'_m для ряда амидгидролаз (см. рис.67).

Оценить значение K_p значительно труднее. Изменение свободной энергии на этой стадии определяется эффективностью вторичных взаимодействий, которые должны компенсировать потерю системой вращательных степеней свободы. Экспериментальные значения, полученные в опытах остановленного потока или температурного скачка (см. разд.6.2.3), возможно, характеризуют кажущееся значение K_p , включающее свободную энергию стабилизации реагирующего фрагмента молекулы. Эти значения для многих исследованных соединений невелики и лежат в области $K_p = 5-20$ (см. табл.68). Лишь для пента- и гексапептидов - субстратов папаина значение константы равновесия второго комплекса составляет 120-250, что соответствует изменению свободной энергии на 2,8-3,3 ккал на моль. Однако тот факт, что многие ингибиторы, как белковые, так и "аналоги переходного состояния", имеют константы ассоциации порядка $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, показывает, что общая величина изменения свободной энергии комплекссообразования может быть значительно выше.

Теоретическая оценка минимальной величины K_p может быть сделана из предположения о строении комплекса $E \cdot O_n$ и числа вращательных степеней свободы, которые система теряет при образовании комплекса $E_p \cdot S_n$. Например если предположить, что в комплексе $E \cdot O_n$ субстрат AcPheAlaNH_2 взаимодействует с химотрипсином только своей ароматической группой, то переход в комплекс $E_p \cdot S_n$ должен сопровождаться замораживанием свободного вращения вокруг 9 σ -связей. Это приведет к потере энтропии около 45 э.е. [2453], т.е. порядка 13 ккал на моль. Эта величина частично компенсируется увеличением энтропии за счет сольватации и должна полностью компенсироваться за счет образования связей с ферментом. Такие оценки, конечно, крайне приближительны, но в принципе расчет величин K_p вполне реален.

Величина энергии стабилизации активной формы субстрата может быть получена из формулы (35), если известны значения K_p и K_s и отношение констант скоростей второго порядка для ферментативной и неферментативной реакций. Если это отношение составляет 10^{10} (см. табл.50), а величина $K_s \approx 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, то даже при $K_p = 1$ величина $K_q = 10^6$, что соответствует изменению свободной энергии на 13,5 ккал/моль. Такая величина представляется мне вполне разумной.

Какова константа скорости собственно химического превращения субстрата (k_5)? Тот факт, что амидгидролазы способны превращать субстраты со скоростями, близкими к диффузионно-контролируемым, свидетельствует о том, что эта константа может быть сравнима с константами скоростей таких реакций (10^8 – 10^9 с⁻¹). Таким образом, допущение, принятое выше, о быстром установлении равновесия в схеме (29) вряд ли оправдывается, и на самом деле лимитирующей стадией является одна из нехимических стадий (см. также: [1716]).

В этом случае определяемые из pH-зависимости скорости реакции значения pK_a функциональных групп фермента имеют смысл кинетических pK_a (см. разд. 5.2.2). Возможно, что именно с этим обстоятельством связана довольно часто наблюдающаяся зависимость значений pK_a групп свободного фермента от типа используемого для определения субстрата.

В рамках предлагаемой модели непродуктивное связывание должно преимущественно происходить на стадии образования фиксированного комплекса фермента с неактивной ($E_p S_n$) или активной ($E_p S_a$) формами субстрата. При этом соответствующая величина константы равновесия (K_n или K_p) будет изменяться на величину $K' = [E_p S'] / [E_p S]$, где $E_p S'$ – непродуктивный комплекс, т. е. на величину $K' = K_p + K_i$, причем эти изменения будут одинаковым образом сказываться на величинах K_{cat} и K_m' , но не будут влиять на их отношение.

Кинетический изотопный эффект растворителя обычно относят к лимитирующей скорости всего процесса переносу протона. В условиях быстрого химического превращения субстрата этот эффект не должен проявляться. Однако, если предшествующие химическому превращению стадии связаны с переносом протона, то эффект может наблюдаться. Кроме того, модель постулирует дестабилизацию расщепляемой связи в продуктивном комплексе, которая может быть связана с частичным переносом протона.

Итак, в основе предлагаемой модели применительно к амидгидролазам лежит концепция, связывающая все события, обуславливающие эффективность и специфичность катализа с особенностями основного состояния субстрата в фермент-субстратном комплексе. Эти особенности заключаются в деформации и резонансной дестабилизации гидролизуемой связи за счет ее расположения вблизи нуклеофила на расстоянии, меньшем суммы Ван-дер-ваальсовых радиусов реагирующих атомов. Потери энергии при этом компенсируются как взаимодействием не реагирующей части субстрата с ферментом, так и частичным перекрыванием связывающих орбиталей нуклеофила и карбонильного С-атома (см. разд. 7.6). Это не приводит к напряжениям в продуктивном комплексе по сравнению с аналогичным основным состоянием субстрата в растворе.

Я вижу основное достоинство предлагаемой модели в том, что она практически не оперирует с переходным состоянием реакции, изучение которого физическими и химическими методами принципиально невозможно, а имеет дело с состояниями, вполне поддающимися изучению. Конечно, на этой стадии модель еще далека от совершенства. Так, факт деформации реагирующей группы обнаружен в комплексах ограниченного числа ферментов с ингибиторами, и нет уверенности, что он отражает состояние истинных фермент-субстратных комплексов. Отсутствуют также сведения о характере взаимодействий на стадиях образования сорбционных и фиксированных комплексов, хотя сам факт стадийности комплексобразования не вызывает сомнения. Дальнейшей разработки требуют вопросы, связанные с pH-зависимостью катализа, изотопными эффектами и т. д.

Центральным вопросом является разработка методов количественного предсказания эффективности и специфичности катализа амидгидролазами, особенно в случае пептидных субстратов. Обнадеживающий путь здесь открывают соотношения линейности свободных энергий. Однако и в этом случае значительные трудности ожидают исследователей, в частности, при объяснении уникальной специфичности некоторых протеаз.

Практически очень мало исследован сам элементарный акт химической трансформации субстрата. В этом отношении важную роль призваны сыграть квантово-химические методы исследования.

Перечисленные здесь проблемы намечают очень схематично программу дальнейшего исследования реакции протеолиза одного из важнейших процессов жизнедеятельности, программу, реализация которой будет важна не только для решения поставленных выше частных вопросов, но и для химической энзимологии в целом.

8.11. Заключение

Недостатком большинства существующих теорий ферментативного катализа является игнорирование того обстоятельства, что основное состояние продуктивного фермент-субстратного комплекса структурно и химически отличается от основного состояния конгруэнтной модельной реакции. Учет этого фактора снимает многие трудности в объяснении эффективности и специфичности ферментов. Фермент как бы "готовит" субстрат к элементарному акту, изменяя свою комплементарность к разным состояниям субстрата по мере его продвижения по координате реакции. Это приводит к тому, что сам элементарный акт происходит с весьма низкими энергиями активации. Такие представления помогают наметить путь к построению общей теории ферментативного гидролиза производных карбоновых кислот и, возможно, ответить на вопрос о причинах уникальной эффективности и специфичности ферментов.

- Dean R.T. Cellular degradative processes. L.: Chapman and Hall, 1978.
- Reichsteiner M., Rogers S., Rote K.// TIBS.1987. Vol.12. P.390-394.
- Proteases and biological control and biotechnology/ Ed. E.Reich, D.B. Rifkin, E.Shaw. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1975.
- Neurath H., Walsh K.A.// Proc.FEBS Meet.1977. Vol.47. P.1-14.
- Локалина Л.А.// Молекуляр.биология. 1979. Т.13. С.1205-1229.
- Proteases in biological control/ Ed. D.D.Cunningham, G.L.Loug. N.Y.: Liss, 1987.
- Шамин А.Н. Биокатализ и биокатализаторы. М.: Наука, 1971.
- Бендер М.Л. Механизмы катализа нуклеофильных реакций производных карбоновых кислот. М.: Мир, 1964.
- Jencks W.P.// Adv.Enzymol. 1975. Vol.43. P.219-410.
- Enzyme Nomenclature, recommendations (1984) of the nomenclature Committee of the IUB. N.Y.: Academic Press, 1984. 646 p. a) Suppl.1// Europ.J. Biochem. 1986. Vol.157. P.1-26; Suppl.2// Ibid. 1989. Vol.179. P.489-533; Suppl.3// Ibid. 1990. Vol.187. P.263-281.
- Ramachandran G.N., Sastisevharan V.// Adv. Protein Chem. 1968. Vol.23. P. 283-437.
- Robin M.B., Bovey F.A., Basch H.// The chemistry of amides/ Ed. J.Zabicky. L.: Interscience, 1970.
- Schulz G.E., Schirmer R.H. Principles of protein structure. N.Y.; Heidelberg; B.: Springer, 1979.
- Pauling L. The nature of the chemical bond. 3rd ed. Ithaca (N.Y.): Cornell Univ.press, 1962.
- Abbreviations and symbol for the description of conformation of polypeptide chains// J.Mol.Biol. 1970. Vol.52. P.1-17
- Ramachandran G.N., Lakshminarayanan A.V., Kolaskar A.S.// Biochim. et biophys.acta. 1973. Vol.303. P.8-13.
- Winkler F.K., Dunitz J.D.// J.Mol.Biol. 1971. Vol.59. P.169 -182.
- Benedetti E.// Peptides: Proc. 5th Amer. Peptides Symp./ Ed.M.Goodman, J.Meinhofer. N.Y.: Wiley, 1977. P.257-273.
- Wiberg K.B., Laidig K.E.// J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.5935-5943
- Costain C.C., Dowling J.M.// J.Chem.Phys. 1960. Vol.32. P.158-165.
- Hirota E., Sugisaki R., Nielsen C.J., Sorensen G.O.// J.Mol.Spectrosc. 1974. Vol.49. P.251-267.
- Ladell J., Post B.// Acta crystallogr. 1954. Vol.7. P.559-564.
- Kimura M., Aoki N.// Bull.Chem.Soc. 1953. Vol.26. P.429-431.
- Senti F., Harker D.// J.Amer.Chem.Soc. 1940. Vol.62. P.2008-2019.
- Lide D.R.// J.Chem.Phys. 1957. Vol.27. P.343-352.
- Swalen J.D., Costain C.C.// Ibid.1959. Vol.31. P.1562-1574.
- Levitt M., Lifson S.// J.Mol.Biol. 1969. Vol.46. P.269-279.
- Scarsdale J.N., van Alsenoy C., Klimkowski V.J. et al.// J.Amer. Chem. Soc. 1983. Vol.105. P.3438-3445.
- Kurland R.J., Wilson E.B.// J.Chem.Phys. 1957. Vol.27. P.585-590.
- Ramachandran G.N.// Biopolymers. 1968. Vol.6. P.1494-1496.
- Pedone C., Benedetti E., Immirzi A., Allegra G.// J. Amer. Chem. Soc. 1970. Vol.92. P.3549-3552.
- Koetzie T.F., Hamilton W.C., Parthasarathy R.// Acta crystallogr.1972. Vol.28B. P.2083-2090.
- Ramachandran G.N., Kolaskar A.S.// Biochim. et biophys. acta. 1973. Vol.303. P.385-388.
- Dunitz J.D., Winkler F.K.// Acta crystallogr. 1975. Vol.31B. P.251-263.
- Kolaskar A.S., Lakshminarayanan A.V., Sarathy K.P., Sastsekharan V.// Biopolymers. 1975. Vol.14. P.1081-1084.
- Zimmerman S.S., Scheraga H.A.// Macromolecules. 1976. Vol.9. P.408-416.
- Peters D., Peters J.// J.Mol.Struot. 1978. Vol.50. P.133-139.
- Carlsen N.R., Radom L., Riggs N.V., Rodwell W.R.// J. Amer. Chem. Soc.

1979. Vol.101. P.2233-2234.
- Benedetti E., Di Blasio B., Pavone V. et al.// J.Biol.Chem. 1981. Vol. 256. P.9229-9234.
- Cleplak A.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.271-273.
- Jeffrey G.A., Houk K.N., Paddon-Row M.N. et al.// Ibid. P.321-326.
- Gill G., Bertolasi V., Bellucci F., Ferretti V.// Ibid. 1986. Vol. 108. P.2420-2424.
- Kolasco A.S., Sarathy K.P.// Biopolymers. 1980. Vol.19. P.1345-1355.
- Delsenhofer J., Steigemann W.// Acta crystallogr. 1975. Vol.31B. P. 238-250.
- Drakenberg T., Forsen S.// J.Phys.Chem. 1970. Vol.74. P.1-7.
- Neuman R.C., Young L.B.// Ibid. 1965. Vol.69. P.2570-2576.
- Rogers M.T., Woodbrey J.C.// Ibid. 1962. Vol.66. P.540-546.
- Wunderlich M.D., Leung L.K., Sandberg J.A. et al.// J. Amer.Chem. Soc. 1978. Vol.100. P.1500-1503.
- Gutowsky H.S., Jonas J., Stiddall T.H.// Ibid. 1967. Vol.89. P.4300-4304.
- Nagakura S.// Mol.Phys. 1960. Vol.3. P.105-112.
- Tanaka J.// J.Chem.Soc.Jap. 1958. Vol.78. P.1636-1643.
- Martin G.J., Goussard J.P., Dorte J. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.1381-138.
- Yoder C.H., Gardner R.D.// J.Org.Chem. 1981. Vol.46. P.64-66.
- Rao C.N.R., Rao K.G., Goel A., Balasubramanian D.// J.Chem.Soc.A.1971. P.3077-3083.
- Christensen D.H., Kortzeborn R.N., Bak B., Led J.J.// J. Chem. Phys. 1970. Vol.53. P.3912-3922.
- Jorgensen W.L., Gao J.// J.Amer.Chem.Soc. 1988. Vol.110. P.4212-4216.
- Hughes D.O.// Tetrahedron, 1968. Vol.24. P.6423-6431.
- Антонов Б.К., Шкряб А.М., Шеманкин М.М.// ЖОХ.1965. Т.35. С.1380-1389.
- Mtshukha S., Shimonouchi T.// Adv.Enzymol. 1961. Vol.23. P.1-27.
- Poland D., Scheraga H.A.// Biochemistry.1967. Vol.6. P.3791-3800.
- Popov E.M., Zheltova V.N.// J.Mol.Struct. 1971. Vol.10. P.221-230.
- Mooney F.A., McGulve R.F., Yan J.F., Scheraga H.A.// J.Phys.Chem.1970. Vol.74. P.2424-2438.
- Itfson S., Hagler A.T., Dauber P.// J.Amer.Chem.Soc. 1979. Vol.101. P. 5111-5121.
- Homer R.B., Johnson C.D.// The chemistry of amides/ Ed. J.Zabisky. L.: Interscience. 1970. P.187-243.
- Katritzky A.R., Jones R.A.Y.// Chem.Industry. 1961. P.722-727.
- Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структуре полипептидов и белков. М.: Наука, 1966.
- Gillespie R.J., Birchall T.// Canad.J.Chem. 1963. Vol.41. P.148-155.
- Fraenkel G., Franconi C.// J.Amer.Chem.Soc. 1960. Vol.82. P.4478-4483.
- Higuchi T., Barnstein C.H., Ghassemi H., Perez W.E.// Anal.Chem. 1962. Vol.34. P.400-412.
- Edward J.T., Chang H.S., Yates K., Steward R.// Canad. J. Chem. 1960. Vol.38. P.1518-1525.
- Hine J., Hine M.// J.Amer.Chem.Soc. 1952. Vol.74. P.5266-5271.
- Pimentel G.C., McClellan A.L. The hydrogen bond. San Francisco: Freeman, 1960.
- Arnett E.M., Mitchell E.J.// J. Amer. Chem. Soc. 1971. Vol.93. P.4052-4053.
- Vinogradov S.N.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1979. Vol.14. P. 281-289.
- Gramsted T., Fuglevik W.J.// Acta chem. scand. 1962. Vol.16. P.1369-1377.
- Takahashi F., Li N.C.// J.Phys.Chem. 1965. Vol.69. P.1622-1627.
- Klotz I.M., Farnham S.B.// Biochemistry. 1968. Vol.7. P.3879-3882.
- Spencer J.N., Garrett R.C., Mayer F.J., et al.// Canad.J.Chem. 1980. Vol.58. P.1372-1375.
- Johansson A., Kollmak P.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.6196-6198.
- Uneyama H., Morokuma K.// Acta crystallogr. 1977. Vol.32B. P.994-1001.
- Del Bene J.E.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.1387-1394.
- Gramstad T., Fuglevik W.J.// Spectrochim. acta. 1965. Vol.21. P.343-344.
- Joesten M.D., Drago R.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1962. Vol.84. P.2696-2699.
- Chen C.Y.S., Swenson C.A.// J.Phys.Chem. 1969. Vol.73. P.1363-1370.
- Taylor R., Kennard O., Verstichel W.// J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.5761-5766.

86. Newman R.C., Woolfenden W.R., Jonas V.// J.Phys.Chem. 1969. Vol.73. P. 3177-3180.
87. Taylor R., Kennard O., Verstichel W.// J.Amer.Chem.Soc. 1984. Vol.106. P.244-248.
88. Jorgensen W.L., Swenson C.J.// Ibid. 1985. Vol.107. P. 1489-1496.
89. Jorgensen W.L.// Ibid. 1989. Vol.111. P. 3770-3771.
90. Levitt M., Perutz M.F.// J.Mol.Biol. 1988. Vol.201. P.751-754.
91. Stigel H., Martin R.B.// Chem.Rev. 1982. Vol.82. P.385-426.
92. Freeman H.C.// Adv.Protein Chem. 1967. Vol.22. P.257-424.
93. Drago R.S., Meek D.W., Joesten M.D., la Roche L.// Inorg. Chem. 1963. Vol.2. P.124-132.
94. Temussi P.A., Tancredi T., Quadrifoglio F.// J.Phys.Chem. 1969. Vol. 73. P.4227-4232.
95. Armbruster A.M., Pullman A.// FEBS Lett. 1974. Vol.49. P.18-21.
96. Collins T.J., Coats R.J., Furutani T.T. et al.// J. Amer. Chem. Soc. 1986. Vol.108. P.5333-5339.
97. Hutton J.V., Richards R.E.// Mol.Phys. 1962. Vol.5. P.139-141.
98. Worcester D.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1978. Vol.75. P.5475-5477.
99. Pauling L.// Ibid. 1979. Vol.76. P.2293-2294.
100. Gra R., Suarez H., Gonzalez R.// Rev. CENIC. Cienc.fis. 1976. Vol.7. P.125-134.
101. Donohue J.A., Scott R.H., Menger F.M.// J.Org.Chem. 1970. Vol.35. P. 2035-2036.
102. Idoux J.P., Klefer G.E., Baker G.R. et al.// Ibid. 1980. Vol.45. P. 441-444.
103. Потапов В.М., Демьянович В.М., Терентьев А.П.// ЖОХ 1961.Т.31. С.3046-3050.
104. Skulski D., Palmer G.C., Calvin M.// Tetrahedron Lett. 1963. P.1773-1776.
105. Cephalosporins and penicillins, chemistry and biology./ Ed. E.H.Flynn. N.Y.: Acad. press, 1972.
106. Page M.I.// Accounts Chem.Res. 1984. Vol.17. P.144-151.
107. Crowfoot D., Bunn C.W. et al.// The chemistry of penicillin. Princeton, 1949, P.310.
108. Sweet R.M., Dahl L.F.// J.Amer.Chem.Soc. 1970. Vol.92. P.5489-5507.
109. Rao S.R., Vasudevan T.K.// CRC Crit.Rev.Biochem. 1983. Vol.14. P.173-206.
110. Ballard S.A., Malstrom D.S., Smith C.W.// The chemistry of penicillin, Princeton. 1949, P.973.
111. Liebman J.F., Greenberg A.// Biophys.Chem. 1974. Vol.1. P.222-226.
112. Bailey J., North A.M.// Trans.Faraday Soc. 1968. Vol.64. P.1499-1504.
113. Pericaudet M., Pullman A.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1973. Vol.5. P.99-107.
114. O'Gorman J.M., Shand W., Schomaker V.// J.Amer.Chem.Soc. 1950. Vol.72. P.4222-4228.
115. Bailey M.// Acta crystallogr. 1949. Vol.2. P.120-126.
116. Laurence C., Guhenent G., Wojtkowiak B.// J.Amer.Chem.Soc. 1979. Vol. 101. P.4793-4801.
117. Арнетт Э.М.// Современные проблемы физической органической химии. М: Мир, 1967. С. 195-341.
118. Tanford Ch.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.2050-2053.
119. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N.Y.: Wiley, 1979.
120. Wolfenden R., Anderson L., Cullis P.M., Southgate C.C.B.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.849-855.
121. Fauchere J.L., Pliska V.// Europ.J.Med.Chem. 1983. Vol.18. P.369-375.
122. Parker J.M., Guo D., Hodges R.S.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.5425-5432.
123. Roseman M.A.// J.Mol.Biol. 1988. Vol.200. P.513-522.
124. Nemethy G., Scheraga H.A.// Quart.Rev.Biophys. 1977. Vol.10. P.239-352.
125. Matthews B.W.//The proteins /Ed. H.Neurath, R.L.Hill, C-L.Boeder. San Francisco; L.; N.Y.: Acad.press. 1977. Vol.3. P.404-590.
126. Rossmann M.G., Argos P.// Ann.Rev.Biochem. 1981. Vol.50. P.497-532.
127. Clothia C.// Annu.Rev.Biochem. 1984, Vol.53. P.537-572.
128. Balci A., Rizzo V., Skrabal P., Lutsl P.L.// J. Amer.Chem. Soc. 1979. Vol.101. P.5170-5178.
129. Toma F., Monnot M., Pirlou F. et al.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1980. Vol.97. P.751-758.
130. Madison V., Kopple K.D.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.4855-4863.
131. Rizzo V., Jackle H.// Ibid. 1983. Vol.105. P.4195-4205.

- Попов Е.М., Лиликин Г.М., Архипова С.Ф., Дашевский Г.М.// Молекуляр. сиология. 1968. Т.2. С.622-630.
- Platzer K.E.B., Momany F.A., Scheraga H.A.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1972. Vol.4. P.187-200.
- Hagler A.T., Letserowitz L., Tuval M.// J.Amer.Chem.Soc. 1976. Vol.98. P.4600-4612.
- Nemethy G., Hodess Z.I., Scheraga H.A.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1978. Vol.75. P.5760-5764.
- Hagler A.T., Stern P.S., Sharon R. et al.// J. Amer. Chem. Soc. 1979. Vol.101. P.6842-6852.
- Peters D., Peters J.// J.Mol.Struct. 1980. Vol.62. P.229-247.
- Weiner S.J., Singh U.C., O'Donnell T.J., Kollman P.A.// J. Amer. Chem. Soc. 1984. Vol.106. P.6243-6245.
- Brooks B.R., Karplus M.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol.80. P.6571-6575.
- Brady J., Karplus M.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.6103-6105.
- Peters D., Peters J.// J.Mol.Struct. 1980. Vol.64. P.103-115.
- Kopple K.D., Marz D.H.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.6193-6200.
- Kreissler M.A., Akhmedov N.A., Arkhipova S.P. et al.// J. Chem. Phys. 1974. Vol.71. P.913-919.
- Boussard G., Marraud M.// Biopolymers. 1981. Vol.20. P.169-185.
- Rossky P.J., Karplus M.// J.Amer.Chem.Soc. 1979. Vol.101. P.1913-1937.
- Oot T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H.A.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.3086-3090.
- Newmark R.A., Miller M.A.// J.Phys.Chem. 1971. Vol.75. P.505-508.
- Drenth J., Jansontus J.N., Koekoek R., Wolthers B.G.// Adv. Protein Chem. 1971. Vol.25. P.79-116.
- Quitocho F.A., Lipscomb W.N.// Ibid. P.1-78.
- Ramachandran G.N., Mitra A.K.// J.Mol.Biol. 1976. Vol.107. P.85-92.
- Easthope P.L., Brayer G.D.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1986. Vol.27. P.666-672.
- Levitt M., Chothia C.// Nature. 1976. Vol.261. P.552-558.
- Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
- Nakashima H., Nishikawa K., Oot T.// J.Biochem. 1986. Vol.99. P.153-162.
- Lesk A.M., Chothia G.// J.Mol.Biol. 1980. Vol.136. P.225-270.
- Wilson I.A., Haft D.H., Getzolf E.D. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1985. Vol.82. P.5255-5259.
- Warne P.K., Morgan R.S.// J.Mol.Biol. 1978. Vol.118. P.273-287.
- Роннишаму Р.К., Prabhakaran M.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. Vol.97. P.1582-1590.
- Rose G.D.// J.Mol.Biol. 1979. Vol.134. P.447-470.
- Barlow D.J., Thornton J.M.// Ibid. 1983. Vol.168. P.867-885.
- Rashin A.A., Honig B.// Ibid. 1984. Vol.173. P.515-521.
- Janin J., Miller S., Chothia C.// Ibid. 1988. Vol.204. P.155-164.
- Glazer A.N.// The proteins/ Ed. H.Neurath, R.L.Hill, C.L.Boeder. San-Francisco; L.; N.Y.: Acad.press. 1976. Vol.2. P.2-115.
- West C.M.// Mol. and Cell.Biochem. 1986. Vol.72. P.3-20.
- Levitt M.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.168. P.595-620.
- Levitt M.// Ibid. P.621-657.
- Lakowicz J.R., Maltwal B.P., Cherek H., Balter A.// Biochemistry.1983. Vol.22. P.1741-1752.
- Жом М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968.
- Tanford C.// Adv.Protein Chem. 1970. Vol.24. P.1-95.
- Эдленберг Д., Кауцман В. Структура и свойства воды. Л.: Наука, 1975.
- Меленков Г.Г.// Физическая химия (ежегодник). М.: Наука, 1984.С.41-76.
- Dewar M.J.S., Thiel W.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.4907-4917.
- Dewar M.J.S., Dieter K.M.// Ibid. 1986. Vol.108. P. 8075-8086.
- Barrett A.J., McDonald J.K.// Biochem.J. 1986. Vol.237. P.935.
- Hartley B.S.// Annu.Rev.Biochem. 1960. Vol.29. P.45-72.
- Hagehara B.// The enzymes/ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press. 1976. Vol.4. P.193-213.
- Клонирование ДНК. Методы/ Под ред. Д.Гловера. М.: Мир, 1988.
- Methods in enzymology/ Ed. G.E. Perlmann, L. Lorand. N.Y.: Acad.press, 1970. Vol. 19.
- Methods in enzymology/ Ed. L.Lorand. N.Y.: Acad.press, 1976. Vol.45.
- Methods in enzymology/ Ed. L.Lorand. N.Y.: Acad.press, 1981. Vol.80.
- Barrett A.J., McDonald J.K. Mammalian proteases: A glossary and bibliography. L.; N.Y.: Acad.press, 1980. Vol.1: Endopeptidases.
- McDonald J.K., Barrett A.J. Mammalian proteases: A glossary and bibliography. L.; N.Y.: Acad.press, 1986. Vol.2: Exopeptidases.

- Азарян А.В. Пептидгидролазы нервной системы и их биологические функции. Ереван: Айастан. 1989.
- Estell D.A., Laskowski M.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.124-131.
- Донкина Д.А., Дилакян Э.А.// Молекуляр.биология. 1986. Т.20. С.1157-1175.
- Suzuki K.// TIBS. 1987. Vol.12. P.103-105.
- Костров С.В., Стронгин А.Я.// Молекуляр.биология. 1989. Т.23. С.255-265.
- Goldberg A.L., St.John A.C.// Annu.Rev.Biochem. 1976. Vol.45. P.747-804.
- Martino G.N.D., Goldberg A.L.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.3712-3715.
- Voelmy R., Murakami K., Goldberg A.L.// Limited proteolysis in microorganisms/ Ed. G.N.Cohen, H.Holzer. Wash (D.C.): DHEW, 1979. P.7-16.
- Edmunds T., Goldberg A.L.// J.Cell.Biochem. 1986. Vol.32. P.187-191.
- Ciechanover A., Hod Y., Hershko A.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1978. Vol.81. P.1100-1105.
- Wilkinson K.D., Urban M.K., Haas A.L.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.7529-7532.
- Hershko A., Ciechanover A., Heller H. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1980. Vol.77. P.1783-1786.
- Etlinger J.D., Goldberg A.L.// Ibid. 1977. Vol.74. P.54-58.
- Rivett A.J.// Arch.Biochem. and Biophys. 1989. Vol.268. P.1-8.
- Hase J.I., Kobashi K., Nakai N. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol.611. P.205-213.
- Alt J., Heymann E., Kirsch K.// Europ.J.Biochem. 1975. Vol.53. P.357-369.
- Holloway M.R., Ticho T.// FEBS Lett. 1979. Vol.106. P.185-188.
- Ambler R.P., Auffret A.D., Clarke P.H.// Ibid. 1987. Vol.215. P.285-290.
- Verret C.R., Roser M.R., Khorana H.G.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.10222-10227.
- Iwayama A., Kimura T., Adachi O., Ameyama M.// Agr. and Biol. Chem. 1983. Vol.47. P.2483-2486.
- Tsushida T., Takeo T.// Ibid. 1985. Vol.49. P.2913-2917.
- Wittwer C.T., Burkhard D., Rirle K. et al.// J.Biol.Chem. 1983. Vol. 258. P.9733-9738.
- Takahashi N., Nishibe H.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.657. P.457-467.
- Sugiyama K., Ishihara H., Tajima S., Takahashi N.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1983. Vol.112. P.155-160.
- Tarentino A.L., Quinones G., Trumble A. et al.// J.Biol.Chem. Vol.265. P.6961-6966.
- Fukushima T., Talbot G., Misono H. et al.// FEBS Lett. 1978. Vol.89. P.298-300.
- Nickerson W.J., Durand S.C.// Biochim. et biophys.acta. 1963. Vol.77. P.87-99.
- Suzuki Y., Uchida K.// Agr. and Biol.Chem. 1985. Vol.49. P.1573-1579.
- Jackson R.L., Matsueda G.R.// Meth.Enzymol.1970. Vol.19. P.591-599.
- McDonald J.K., Letbach F.H., Crindeland R.E., Ellis S.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.4143-4150.
- Eisenhauer D.A., McDonald J.K.// Ibid. 1986. Vol.261. P.8859-8865.
- Mollay Ch., Vilas U., Huttcher A., Krell G.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.160. P.31-35.
- Alvarez N.G., Bordallo C., Gascon S., Rendueles P.S.// Biochim.et biophys.acta. 1985. Vol.832. P.119-125.
- Yoshimoto T., Tsuru D.// J.Biochem. 1982. Vol.91. P.1899-1906.
- Swanson A.A., Albers-Jackson B., McDonald J.K.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1978. Vol.84. P.1151-1159.
- Gorenstein C., Snyder S.H.// Proc.Roy.Soc.London.B 1980. Vol.210. P.123-132.
- Lee Ch.M., Snyder S.H.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.12043-12050.
- Saton M., Verlinden J., van Leuven F. et al.// Biochem.J. 1983. Vol. 216. P.177-183.
- Kenny J., Booth A.G., George S.G. et al.// Ibid. 1976. Vol.157. P.169-182.
- Fukasawa K.M., Fukasawa K., Hiraoaka B.Y., Harada M.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.657. P.179-189.
- Yoshimoto T., Kita T., Ichinose M., Tsuru D.// J.Biochem. 1982. Vol. 92. P.275-282.

- Yoshimoto T., Walter R.// Biochim. et Biophys.acta. 1977. Vol.485. P. 391-401.
- MacNair R.D.C., Kenny A.J.// Biochem.J. 1979. Vol.179. P.379-395.
- Kikuchi M., Fukuyama K., Epstein W.L.// Arch. Biochem. and Biophys. 1988. Vol.266. P.369-376.
- Ogata S., Misumi Y., Ikehara Y.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.3596-3601.
- Barth A., Schulz H., Neubert K.// Acta biol. med. germ. 1974. Vol.32. P.157-174.
- Fukasawa K.M., Fukasawa K., Hiracka B.Y., Harada M.// Experientia. 1983. Vol.39. P.1005-1007.
- McDonald J.K., Holstington A.R., Eisenhauer D.A.// Biochem.and Biophys. Res.Comm. 1985. Vol.126. P.63-71.
- Bälw R.-M., Ragnarsson U., Zetterqvist O.// J.Biol.Chem. 1983. Vol. 258. P.11622-11628.
- Bälw R.-M., Tomkinson B., Ragnarsson U., Zetterqvist O.// Ibid. 1986. Vol.261. P.2409-2417.
- Bälw R.-M., Eriksson I.// Biochem.J. 1987. Vol.241. P.75-80.
- Matsuda K., Mtsaka E.// J.Biochem. 1974. Vol.76. P.639-649.
- Steve L.J., Jappel A.L.// Biochim. and Biophys.acta. 1974. Vol.341. P. 99-111.
- Kawamura Y., Matoba T., Dot E.// J.Biochem. 1980. Vol.88. P.1559-1561.
- Mtola L.// Biochim. and Biophys.acta. 1983. Vol.747. P.241-252.
- Sorensen S.B., Breddam K., Svendsen I.// Carlsberg Res. Commun. 1986. Vol.51. P.475-485.
- Sorensen S.B., Svendsen I., Breddam K.// Ibid. 1987. Vol.52. P.285-295.
- Breddam K., Sorensen S.B.// Ibid. P.275-283.
- Breddam K., Sorensen S.B., Svendsen I.// Ibid. P.297-311.
- Сарбаскинова Ш.Т., Дунаевский Я.Е., Белосерский М.А., Руденская Г.Н.// Биохимия. 1987. Т.52. С.1263-1269.
- Wells J.R.E.// Biochem. and biophys.acta. 1968. Vol.167. P.388-398.
- Zuber H.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1968. Vol.349. P.1337-1352.
- Zuber H.//Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.561-568.
- Funakoshi T., Shoji S., Hayata S., Kubota Y.// Chem. and Pharm. Bull. 1985. Vol.33. P.5428-5436.
- Shoji S., Nartmatsu S., Morita T. et al.// Ibid. P.4963-4972.
- Kuhn R.W., Walsh K.A., Neurath H.// Biochemistry. 1974.Vol.13. P.3871-3877.
- Hayashi R.// Meth. Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.568-587.
- Svendsen I., Martin B.M., Viswanatha T., Johansen J.T.// Carlsberg Res.Comm. 1982. Vol.47. P.15-27.
- Hofmann T.// Meth. Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.587-599.
- Kumamoto K., Stewart T.A., Johnson A.R., Erdos E.G.// J. Clin. Invest. 1981. Vol.67. P.210-215.
- Ody C.E., Erdos E.G.// Meth.Enzymol. 1981. Vol.80. P.460-466.
- Yang H.Y.T., Erdos E.G., Chiang T.S. et al.// Biochem.Pharmacol. 1970. Vol.19. P.1201-1211.
- Frere J.-M., Legh-Bouille M., Ghuyssen J.M. et al.// Meth. Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.610-636.
- Ambler R.P., Meadoway R.J.// Nature. 1969. Vol.222. P.24-26.
- Waxman D.J., Strominger J.L.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.3964-3976.
- Frere J.M., Joris B.// CRC Crit.Rev.Microbiol. 1985. Vol.11. P.299-335.
- Joris B., Ghuyssen J.M., Dine G. et al.// Biochem.J. 1988. Vol.250. P. 313-324.
- Yocum R.R., Blumberg P.M., Strominger J.L.// J.Biol.Chem.1974. Vol.249. P.4863-4871.
- Blumberg P.M., Strominger J.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1972. Vol.69. P.3751-3755.
- Georgopapadakov N., Hammarstrom S., Strominger J.L.// Ibid. 1977. Vol. 74. P.1009-1012.
- Schonberger O.L., Teschesche H.// Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 1981. Vol.362. P.865-873.
- Tsunasawa S., Narita K.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.552-561.
- Kobayashi K., Smith J.A.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.11435-11445.
- Nadao N.J., Mukhopadhyay S., Campbell B.J.// Biochim. et biophys. acta. 1975.Vol.377. P.146-157.
- Stimmons W.H., Walter R.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.39-48.

269. Coan M.H., Roberts R.C., Travis J.// Ibid. 1971. Vol.10. P.2711-2717.
270. Travis J.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1972. Vol.48. P.1111-1116.
271. Desnuelle P.// The enzymes/ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press, 1960. Vol. 4. P.93-118.
272. Hartley B.S.// Nature. 1964. Vol.201. P.1284-1288.
273. Meloun B., Kluh J., Kostka V. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1966. Vol.130. P.543-546.
274. Smillie L.B., Furka A., Nagabhushan N. et al.// Nature. 1968. Vol.218. P.343-345.
275. Charles M., Gratecos D., Rovey M., Desnuelle P.// Biochim. et biophys.acta. 1967. Vol.140. P.395-409.
276. Koide A., Kataoka T., Matsuoka Y.// J.Biochem. 1969. Vol.65. P.475-477.
277. Matsuoka Y., Koide A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1966. Vol.114. P. 422-424.
278. Koide A., Matsuoka Y.// J.Biochem. 1970. Vol.68. P.1-7.
279. Ryan C.A., Clary J.J., Jomimatsu Y.// Arch.Biochem. and Biophys. 1965. Vol.110. P.175-183.
280. Bell G.I., Quinto C., Quiroga M. et al.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.14265-14270.
281. Mockel W., Barnard E.A.// Biochim. et biophys.acta. 1969. Vol.191. P. 370-378.
282. Barnard E.A., Hope W.C.// Ibid. 1969. Vol.178. P.364-369.
283. Tsai I.-H., Liu H.-C., Chuang K.-L.// FEBS Lett. 1986. Vol.203. P.257-261.
284. Law J.H., Dunn P.E., Kramer K.J.// Adv.Enzymol. 1977. Vol.45. P.389-425.
285. Jany K.-D., Haug H.// FEBS Lett. 1983. Vol.158. P.98-102.
286. Jany K.-D., Haug H., Pfliderer G., Ishay J.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4675-4682.
287. Folk J.E., Schirmer E.W.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.181-197.
288. Tobita T., Folk J.E.// Biochim. et biophys.acta. 1967. Vol.147. P.15-25.
289. Gratecos D., Desnuelle P.// Biochem. and Biophys.Res.Comm.1971. Vol. 42. P.857-864.
290. Gibson D., Dixon G.M.// Nature. 1969. Vol.222. P.753-756.
291. Travis J., Roberts R.C.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.2884-2889.
292. Schroeder D.D., Shaw E.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.2943-2949.
293. Emt M., Nakamura Y., Ogawa M. et al.// Gene. 1986. Vol.41. P.305-310.
294. Walsh K.A., Neurath H.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1964. Vol.52. P.884-889.
295. Mikeš O., Tomášek V., Holeyšovsky V., Šorm F.// Biochim. et biophys. acta. 1966. Vol.117. P.281-284.
296. Hermodson M.A., Ericsson L.H., Neurath H., Walsh K.A.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.3146-3153.
297. Smith R.A., Ltener I.E.// J.Biol.Chem. 1967. Vol.242. P.4033-4039.
298. Travis J., McElroy W.D.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1968. Vol. 30. P.730-734.
299. Stevenson B.J., Hedenbuechle O., Wellauer P.K.// Nucl.Acid Res. 1986. Vol.14. P.8307-8330.
300. Craik C.S., Choo Q.-L., Swift G.H. et al.// J.Biol.Chem. 1984. Vol. 259. P.14255-14264.
301. Fletcher T.S., Alnadeff M., Craik C.S., Largman C.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.3081-3086.
302. Gendry P., Launay J.-F.// Biochim. and biophys.acta. 1988. Vol.955. P. 243-249.
303. Lacko A.G., Neurath H.// Biochem. and Biophys.Res.Comm.1967. Vol.26. P.272-277.
304. Bradshaw R.A., Neurath H., Tye R.W. et al.// Nature.1970. Vol.226. P. 237-239.
305. Asgeton B., Fox J.W., Bjarnason J.B.// Europ.J.Biochem. 1989. Vol. 180. P.85-94.
306. Sawada H., Mura M., Yokosawa H., Ishii S-t.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1984. Vol.121. P.598-604.
307. Sawada H., Yokosawa H., Ishii S-t.// J.Biol.Chem.1984.Vol.259. P.2900-2904.
308. Camacho L., Brown J.R., Kitto G.B.// Ibid. 1970. Vol.245. P.3964-3972.
309. Pfliderer J., Zwilling R., Sonneborn H.-H.// Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol.Chem. 1967. Vol.348. P.1319-1331.

- Titant K., Sasagawa T., Woodbury R.G. et al.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.1459-1465.
- Jany K.D., Bekelar K., Pfleiderer G., Ishay J.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. Vol.110. P.1-7.
- Kafotos F.C., Tartakoff A.M., Law J.H.// J.Biol.Chem. 1967. Vol. 242. P.1477-1487.
- Lundblad R.L., Kingdon H.S., Mann K.G.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.156-176.
- Butkowski R.J., Elton J., Downing M.R., Mann K.G.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.4942-4957.
- Mann K.G., Elton J., Butkowski R.J. et al.// Meth.Enzymol. 1981. Vol. 80, Pt.C. P.286-302.
- Elton J., Downing M.R., Butkowski R.J., Mann K.G. //Chemistry and biology of thrombin/ Ed. R.L.Lundblad, J.W.Fenton, K.G.Mann. Ann Arbor: Ann Arbor Sci.Publ., 1977. P.97-111.
- Magnusson S., Petersen T.E., Sottrup-Jensen L., Claeys H.// Proteases and biological control/ Ed. E.Reich, D.B.Rifkin, E.Shaw. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P.123-145.
- MacGillivray R.T.A., Davie E.W.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.1626-1634.
- Irwin D.M., Robertson K.A., MacGillivray R.T.A.// J.Mol.Biol. 1988. Vol.200. P.31-45.
- Titant K., Fujikawa K., Enfield D.L. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1975. Vol.72. P.3082-3086.
- DiScipio R.G., Hermonson M.A., Yates S.G., Davie E.W.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.698-706.
- Robison D.J., Furie B., Furie B.C., Bing D.H.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.2014-2021.
- Hashimoto N., Morita T., Iwanaga S.// J.Biochem. 1985. Vol.97. P.1347-1355.
- Robbins K.C., Summaria L.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.257-273.
- Petersen T.E., Maritzen M.R., Ichinose A., Davie E.W.// J.Biol.Chem. 1990. Vol.265. P.6104-6111.
- Malnowski D.P., Sadler J.E., Davie E.W.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.4243-4250.
- Forsgren M., Råden B., Israelsson M. et al.// FEBS Lett. 1987. Vol. 213. P.254-260.
- Brunisholz R.A., Rickli E.E.// Europ.J.Biochem. 1981. Vol.119. P.15-22.
- Grant D.A.W., Magee A.I., Hermon-Taylor J.// Ibid.1978. Vol.88. P.183-189.
- Lipnitsky J.J., Light A.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.1677-1683.
- Fonseca P., Light A.// Ibid. 1983. Vol.258. P.14516-14520.
- Baratt J., Marcoux S., Louvard D., Desnuelle P.// Biochim. et biophys. acta. 1976. Vol.452. P.488-496.
- Baba T.// FEBS Lett. 1989. Vol.244. P.296-300.
- Schleuning W.D., Fritz H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.330-342.
- Brown C.R., Andani Z., Hartree E.F.// Biochem.J. 1975. Vol.149. P.133-146.
- Baba T., Kashtwabara S-t., Watanabe K. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.11920-11927.
- Whittaker D.R., Jurasek L., Roy C.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. Vol.24. P.173-178.
- Olson M.O.J., Nagabhushan N., Dzwinel M. et al.// Nature. 1970. Vol. 228. P.438-442.
- Боровикова В.П., Аксеновская В.Е., Лавренова В.Е. и др.// Биохимия. 1980. Т.45. С.1524-1533.
- Jacobs // Nucl.Acids.Res. 1985. Vol.13. P.8913-8926.
- Smith E.L., DeLange R.J., Ewans W.H. et al.// J.Biol.Chem. 1968. Vol. 243. P.2184-2191.
- Ottesen M., Svendsen I.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.199-215.
- Markland F.S., Smith E.L.// The enzymes/ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad. press, 1971. Vol.3. P.561-608.
- Shoer R., Rappoport H.P.// J.Bacteriol. 1972. Vol.139. P.575-583.
- Stahl M.L., Ferrari E. // Ibid. 1984. Vol.158. P.411-418.
- Wells J.A., Ferrari E., Henner DJ et al.// Nucl.Acids Res.1983. Vol.11. P.7911-7925.
- Matubara H., Kasper C.B., Brown D.M., Smith E.L.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.1125-1130.

- Olatun S.A., de Lange R.J., Smith E.L.// Ibid. 1968. Vol.243. P.5296-5301.
- Nedkov P., Oberthur W., Braunitzer G.// Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol.Chem. 1983. Vol.364. P.1537-1540.
- Rappaport H.P., Riggsby W.S., Holden D.A.// J.Biol.Chem.1965. Vol.240. P.78-86.
- Stepanov V.M., Strongin A.Ya., Isotova L.S. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1977. Vol.77. P.298-305.
- Koide Y., Nakamura A., Uozumi T., Beppu T.// J.Bacteriol. 1986. Vol. 167. P.110-116.
- Pacaud M., Uriel J.// Europ.J.Biochem. 1971. Vol.23. P.435-442.
- Pacaud M., Sibille L., Le Bras G.// Ibid. 1976. Vol.69. P.141-151.
- Pacaud M., Richaud C.// J.Biol.Chem. 1975. Vol.250. P.7771-7779.
- Pacaud M.// Europ.J.Biochem. 1976. Vol.64. P.199-204.
- Regnier Ph.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1981. Vol.99. P.1369-1376.
- Ichihara S., Suzuki T., Suzuki M., Mizushima S.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.9405-9411.
- Palmer S.M., St.John A.C.// J.Bacteriol. 1987. Vol.169. P.1474-1479.
- Pacaud M.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.4333-4339.
- Sugimura E., Nishihara T.// J.Bacteriol. 1988. Vol.170. P.5625-5632.
- Goldberg A.L., Sreedhara-Swamy K.H., Chung C.-H., Larimore F.S. // Meth.Enzymol. 1981. Vol.80. P.680-702.
- Chung C.-H., Goldberg A.L.// J.Bacteriol. 1983. Vol.154. P.231-238.
- Suendsen I., Genov N., Idakieva K.// FEBS Lett. 1986. Vol.196. P.228-232.
- Matsubara H., Feder J.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.721-795.
- Turková J., Mikeš O., Hayashi K. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1972. Vol.257. P.257-263.
- Mikeš O., Turková J., Toan N.B., Šorm F.// Ibid. 1969. Vol.178. P.112-117.
- Trop M., Birk Y.// Biochem.J. 1968. Vol.109. P.475-482.
- Narahashi Y.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.651-664.
- Henderson G., Krygeman P., Liu C.J. et al.// J.Bacteriol. 1987. Vol. 169. P.3778-3784.
- Jurašek L., Carpenter M.R., Smillie L.B. et al.// Biochim.and Biophys. Res.Comm. 1974. Vol.61. P.1095-1100.
- Narahashi Y., Yoda K.// J.Biochem. 1977. Vol.81. P.587-597.
- Камузер С.В., Боровикова В.П., Лавренова Г.И. и др.// Биохимия 1983. Т.48. С.1483-1490.
- Лавренова Г.И., Гульник С.В., Камузер С.В. и др.// Там же. 1984. Т.49. С.531-539.
- Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С. и др.// Там же. 1983. Т.48. С.1365-1373.
- Hofsten B.V., Van Kley H., Eaker D.// Biochim. et biophys.acta. 1965. Vol.110. P.585-598.
- Wahlby S.// Ibid. 1968. Vol.151. P.409-413.
- Ebeling W., Hennrich N., Klockow M. et al.// Europ.J.Biochem. 1974. Vol.47. P.91-97.
- Jany K.D., Mayer B.// Biol.Chem.Hoppe-Seyler. 1985. Vol.366. P.485-492.
- Jany K.D., Lederer G., Mayer B.// FEBS Lett. 1986. Vol.199. P.139-144.
- Gaucher G.M., Stevenson K.J.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P. 415-433.
- Gusek T.W., Kinsella J.E.// Biochem.J. 1987. Vol.246. P.511-517.
- Taguchi H., Hamaoki M., Matsuzawa H., Ohta T.// J.Biochem. 1983. Vol. 93. P.7-13.
- Matsuzawa H., Tokugawa K., Hamaoki M. et al.// Europ.J.Biochem. 1988. Vol.171. P.441-447.
- Kwon S.T., Terada I., Matsuzawa H., Ohta T.// Ibid. 1988. Vol.173. P. 491-497.
- Kwon S.T., Matsuzawa H., Ohta T.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.557-559.
- Sloma A., Rufo G.A., Rudolph C.F. et al. // J.Bacteriol. 1990. Vol. 172. P.1470-1477.
- Boguslawski G., Shultz J.L., Yehle C.O.// Anal.Biochem. 1983. Vol.132. P.41-49.
- Leger R.J.S., Charnley A.K., Cooper R.M.// Arch. Biochem. and Biophys. 1987. Vol.253. P.221-232.
- Asahi M., Lindquist R., Fukuyama K. et al.// Biochem.J. 1985. Vol.232. P.139-144.

- Cowan D.A., Smolenski K.A., Dantel R.M., Morgan H.W.// Ibid.1987. Vol. 247. P.121-133.
- Lockau W., Massalski M., Dirmeter A.// Europ.J.Biochem. 1988. Vol.172. P.433-438.
- Vos P., Simons G., Siezen R.J. De Vos W.M.// J.Biol.Chem. 1989. Vol. 264. P.13579-13585.
- Kleine R., Rothe U., Kettmann U., Schelle H.// Proteinases and their inhibitors: Proc.Intern.Symp.Portorož (Yugosl.)/ Ed.V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Ml.kn.; Oxford: Pergamon press, 1981. P.201-212.
- Stepanov V.M., Chestukhtina G.G., Rudenskaya G.N. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1981. Vol.100. P.1680-1687.
- Meloun B., Baudys M., Kostka V. et al.// FEBS Lett. 1985. Vol.183. P. 195-200.
- Jonsson A.G.// Arch.Biochem. and Biophys. 1969. Vol.129. P.62-67.
- Zwilling V.R.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1968. Vol.349. P. 326-332.
- Tong N.T., Imhoff J.M., Leorotsey A., Kell B.// Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol.658. P.209-219.
- Leorotsey A., Tong N.T., Kell B.// Europ.J.Biochem. 1983. Vol.134. P. 261-267.
- Ryden A.C., Ryden L., Phillips L.// Ibid. 1974. Vol.44. P.105-114.
- Drapeau G.R.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.469-475.
- Drapeau G.R.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P.5899-6001.
- Carmona C., Gray G.L.// Nucl. Acid Res. 1987. Vol.15. P.6757.
- Arvidson S., Holme T., Lindholm B.// Biochim. et biophys. acta. 1973. Vol.302. P.135-148.
- Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K. et al.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.451-456.
- Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М. и др.// Биохимия. 1987. Т.52. С.414-422.
- Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П. и др.// Там же. 1989. Т. 54. С.46-53.
- Васильева Х.И., Руденская Г.Н., Крестьянова И.Н. и др.// Там же. 1985. Т.50. С.355-362.
- Руденская Г.Н., Степанов В.М., Захарова Ю.А. и др.// Там же. 1987. Т. 52. С.1735-1755.
- Feinstein G., Janoff A.// Biochim. et Biophys.acta. 1975. Vol.403. P. 477-492.
- Salvesen G., Farley D.; Shuman J. et al.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.2289-2293.
- Starkey P.M., Barrett A.J.// Biochem.J. 1976. Vol.155. P.255-263.
- Marossy K., Hauck M., Eliot P.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol. 662. P.36-40.
- Краева Л.Н., Кокряков В.Н, Чесноков И.Н. и др.// Биохимия. 1988. Т.53. С.655-662.
- Radeloff R., Nemerson Y.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.49-56.
- Davie E.W., Fujikawa K., Kuracht K., Kistel W.// Adv.Enzymol. 1979. Vol.48. P.277-318.
- Kistel W., Fujikawa K., Davie E.W.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P. 4189-4194.
- Byrne R., Link R.P., Castellino F.J.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P. 5336-5341.
- Yoshitake S., Schach B.G., Foster D.C. et al.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.3736-3750.
- Emon C.T.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.964-973.
- Kane W.H., Majerus P.W.// Ibid. 1981. Vol.256. P.1002-1007.
- Jenny R.J., Pittman D.D., Toole J.J. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.4846-4850.
- Fay P.Y., Chavín S.I., Schroeder D. et al.// Ibid. 1982.Vol.79. P.7200-7204.
- Eaton D.L., Hass P.E., Riddle L. et al.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.3285-3290.
- Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M. et al.// Nature. 1984. Vol.312. P.342-347.
- Truett M.A., Blacher R., Burke R.L. et al.// DNA. 1985. Vol.4. P.333-349.
- Bonthron D., Orr E.C., Mitscock L.M. et al.// Nucl.Acids Res. 1986. Vol.14. P.7125-7127.
- Kistel W.// J.Olin.Invest. 1979. Vol.64. P.761-769.
- Long G.L., Belagaje R.M., MacGillivray R.T.A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA.

1984. Vol.81. P.5653-5656.

Plutsky J., Hoskins J.A., Long G.L., Crabtree G.R.// Ibid. 1986. Vol. 83. P.546-550.

Nakamura T., Morita T., Iwanaga S.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.154. P. 511-521.

Tokunaga F., Miyata T., Nakamura T. et al.// Ibid. 1987. Vol.167. P. 405-416.

Furie B.C., Furie B.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.191-205.

Witheller J., Wilson D.B.// J.Biol.Chem. 1972. Vol.247. P.2217-2221.

Kaneda M., Tomioka N.// J.Biochem. 1975. Vol.78. P.1287-1296.

Soeda S., Ohya M., Yamakawa N. et al.// Chem. and Pharm.Bull. 1984. Vol.32. P.4061-4069.

Soeda S., Ohya M., Nagamatsu A.// Ibid. P.1510-1516.

Yamakawa N., Soeda S., Shimeno H., Nagamatsu A.// Ibid. 1986. Vol.34. P.256-263.

Moriyama A., Nakantshi M., Sasaki M.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P. 112-117.

Knisatschek H., Bauer K.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.10936-10943.

Rupnow J.H., Taylor W.L., Dixon J.E.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P. 1206-1212.

Andrews P.C., Hines C.M., Dixon J.E.// Ibid. 1980. Vol.19. P.5494-5500.

Yoshimoto T., Simmons W.H., Kita T., Tsuru D.// J.Biochem. 1981. Vol. 90. P.325-334.

Yoshimoto T., Nishimura T., Kita T., Tsuru D.// Ibid. 1983. Vol.94. P.1179-1190.

Yoshimoto T., Sattar A.K.M.A., Hirose W., Tsuru D.// Biochim. et biophys.acta. 1987. Vol.916. P.29-37.

Yoshimoto T., Sattar A.K.M.A., Hirose W., Tsuru D.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.622-627.

Yoshimoto T., Walter R., Tsuru D.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P. 4786-4792.

Fujikawa K., Chung D.W., Hendrickson L.E., Davie E.W.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.2417-2424.

Nolan C., Hall L.S., Barlow G.H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P:205-213.

Orthner C.L., Bhattacharya P., Strickland D.K.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.2558-2564.

Kistel W., Kondo S., Smith K.J. et al.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.12607-12613.

Holleman W.H., Weiss L.J.// Ibid. 1976. Vol.251. P.1663-1669.

Itoh N., Tanaka N., Mitsuhashi S. et al.// Ibid. 1987. Vol.262. P.3132-3135.

Markland F.S.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.223-236.

Pirkle H., Markland F.S., Theodor I. et al.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1981. Vol.99. P.715-721.

Bjarnason J.B., Barish A., Drenzo G.S. et al.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.12566-12573.

Sapru Z.Z., Tu A.T., Bailey G.S.// Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol.747. P.225-231.

Pandya B.V., Budzynski A.Z.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.460-470.

Shu Y.-Y., Moran J.B., Geren C.R.// Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol.748. P.236-244.

Shieh T.-C., Tanaka S., Kihara H. et al.// J.Biochem. 1985. Vol.98. P.713-721.

Shieh T.-C., Kawabata S.-t., Kihara H. et al.// Ibid. 1988. Vol.103. P.596-605.

Barlow G.H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.239-244.

Schaller J., Nick H., Ricklt E.E. et al.// Europ.J.Biochem. 1982. Vol. 125. P.251-257.

Winkler M.E., Blaber M.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.4041-4045.

Belin D., Vassalli J.-D., Combeptne C. et al.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.148. P.225-232.

Kasai S., Arimura H., Nishida M., Suyama T.// J.Biol.Chem. 1985. Vol. 260. P.12382-12389.

Degen S.J.F., Rajput B., Retch E.// Ibid. 1986. Vol.261. P.6972-6985.

Eaton D.L., Scott R.W., Baker J.B.// Ibid. 1984. Vol.259. P.6241-6247.

Eisen A.Z., Henderson K.O., Jeffrey J.J., Bradshaw R.A.// Biochemist-
ry. 1973. Vol.12. P.1814-1822.

- Grant G.A., Sacchettini J.C., Welgus H.G.// Ibid. 1983. Vol.22. P.354-358.
- Grant G.A., Henderson K.O., Eisen A.Z., Bradshaw R.A.// Ibid. 1980. Vol.19. P.4653-4659.
- Hurlon N., Fromentin H., Kell B.// Comp.Biochem. and Physiol.B. 1977. Vol.56. P.259-264.
- Hurlon N., Fromentin H., Kell B.// Arch. Biochem. and Biophys. 1979. Vol.192. P.438-445.
- Сазаров И.Ю., Лимбин Ф.Е., Артюков А.А., Кофанова Н.Н.// Биохимия. 1988. Т.53. С.1844-1849.
- Yoshinaka R., Sato M., Itoko M. et al.// J.Biochem. 1986. Vol.99. P.459-467.
- Colman R.W., Bagdasarian A.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.303-322.
- Sampato C., Wong S.-C., Shaw E.// Arch. Biochem. and Biophys. 1974. Vol.165. P.133-139.
- Mandile R., Kaplan A.P.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.6097-6104.
- Scott C.F., Liu C.Y., Colman R.W.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.100. P.77-83.
- Nagase H., Barrett A.J.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P.187-192.
- Chao J., Chao L., Margolius H.S.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1984. Vol.121. P.722-729.
- Takahashi S., Irie A., Miyake Y.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.22-29.
- Takahashi H., Nagasawa S., Suruki T.// Ibid. 1972. Vol.71. P.471-483.
- Kikuno Y., Takahashi H., Suruki T.// Ibid. 1983. Vol.93. P.235-241.
- Lundwall A.// Biochem. and Biophys.Res.Commun. 1989. Vol.161. P.1151-1159.
- Iazure C., Ledue R., Seidah N.G., Chrétien M.// FEBS Lett. 1984. Vol. 175. P.1-7.
- Matsas R., Proud D., Nustad K., Bailey G.S.// Anal.Biochem. 1981. Vol. 113. P.264-270.
- Swift G.H., Dagorn J.C., Ashley P.L. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1982. Vol.79. P.7263-7267.
- Mason A.J., Evans B.A., Cox D.R. et al.// Nature.1983. Vol.303. P.300-307.
- Fahnestock M., Brundage S., Shooter E.M.// Nucl.Acids Res. 1986. Vol. 14. P.4823-4835.
- Ban Y., Wang M.C., Watt K.W.K. et al.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1984. Vol.123. P.482-488.
- Watt K.W.K., Lee P.J., M'Timkulu T. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1986. Vol.83. P.3166-3170.
- Szlegoleit A., Linder D., Schbüter M. et al.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.151. P.595-599.
- Largman C.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.3763-3770.
- Shotton D.M., Hartley B.S.// Nature. 1970. Vol.225. P.802-805.
- McDonald R.J., Swift G.H., Quinto C. et al.// Biochemistry. 1982. Vol. 21. P.1453-1463.
- Swift G.H., Cralk C.S., Stary S.J. et al.// J.Biol.Chem. 1984. Vol. 259. P.14271-14278.
- Hartley B.S., Shotton D.H.// The enzymes. 3rd ed./ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press, 1971. Vol.3. P.323-373.
- Ardelt W.// Biochim. et biophys.acta. 1975. Vol.393. P.267-273.
- Tani T., Ohsumi J., Mita K., Takiguchi Y.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.1231-1239.
- Mallory P.A., Travis J.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.722-729.
- Kerfelec B., Cambillau C., Putgsever A., Chapus C.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.157. P.531-538.
- Cambillau Ch., Kerfelec B., Scraky M., Chapus C.// FEBS Lett. 1988. Vol.232. P.91-95.
- Shirasu Y., Takemura K., Yoshida H. et al.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.259-264.
- Shen W.-F., Fletcher Th.S., Largman C.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.3447-3452.
- Felstein G., Janott A.// Biochim. et biophys.acta. 1975. Vol.403. P. 493-505.
- Baugh R.Y., Travis J.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.836-841.
- Stnha S., Watorek W., Karr S. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1987. Vol.84. P.2228-2232.
- Takahashi H., Nukitwa T., Yoshimura K. et al.// J.Biol.Chem. 1988. Vol. 263. P.14739-14747.
- Aoki Y.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P.2026-2032.

- Okano K., Aoki Y., Sakurai T. et al.// J.Biochem. 1987. Vol.102. P. 13-16.
- Okano J., Aoki Y., Shimizu H., Naruto M.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. Vol.167. P.1326-1332.
- McKerrow J.H., Pino-Heias S., Lindquist R., Werb Z.// J.Biol. Chem. 1985. Vol.260. P.3703-3707.
- Newport C.R., McKerrow J.H., Hedstrom R. et al.// Ibid. 1988. Vol.263. P.13179-13184.
- Fujikawa K., Walsh K.A., Davte E.W.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P. 2270-2278.
- Claeys H., Collen D.// Europ.J.Biochem. 1978. Vol.87. P.69-74.
- McMullen B.A., Fujikawa K.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.5328-5341.
- Tripodi M., Cittarella F., Guida S. et al.// Nucl.Acids Res. 1986. Vol. 14. P.3146.
- Johnson L.A., Moon K.E., Eisenberg M.// Anal.Biochem. 1986. Vol.155. P.358-364.
- Woodbury R.G., Neurath H.// FEBS Lett. 1980. Vol.114. P.189-196.
- Woodbury R.G., Katunuma N., Kobayashi K. et al.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.811-819.
- Le Trong H., Parmelee D.C., Walsh K.A. et al.// Ibid. 1987. Vol.26. P.6988-6994.
- Everitt M.T., Neurath H.// Biochemie. 1979. Vol.61. P.653-662.
- Kido H., Fukusen N., Katunuma N.// Anal.Biochem. 1984. Vol.137. P.449-453.
- Woodbury R.G., Neurath H.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4298-4304.
- Kido H., Fukusen N., Katunuma N.// Arch. Biochem. and Biophys. 1985. Vol.239. P.436-443.
- Benfey P.N., Yin F.H., Leder P.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.5377-5384.
- Schwartz L.B., Lewis R.A., Austen K.F.// Ibid. 1981. Vol.256. P.11939-11943.
- Cromlish J.A., Seidah N.G., Marcinkiewicz M. et al.// Ibid. 1987. Vol. 262. P.1363-1373.
- Vanderslice P., Craik Ch.S., Nadel J.A., Caughey G.H.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.4148-4155.
- Tanaka K., Nakamura T., Ichihara A.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P. 2610-2615.
- Meter M., Kwong P.C., Freglau C.J. et al.// Biochemistry. 1990. Vol. 29. P.4042-4049.
- Simon M.M., Hsochutsky H., Fruth U. et al.// EMBO J. 1986. Vol.5. P. 3267-3274.
- Masson D., Tschopp J.// Cell. 1987. Vol.49. P.679-685.
- Fruth U., Eckerskorn C., Lottepech F. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol. 237. P.45-48.
- Poe M., Bennett C.D., Biddalson W.E. et al.// J.Biol.Chem. 1988. Vol. 263. P.13215-13222.
- Lobe C.G., Finlay B.B., Paranchych W. et al.// Science. 1986. Vol.232. P.858-861.
- Gershenfeld H.K., Weissman I.L.// Ibid. P.854-858.
- Jenne D., Rey C., Hasfetger J.-A. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1988. Vol.85. P.4814-4818.
- Jenne D.E., Masson D., Zimmer M. et al.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.7953-7961.
- La Bombardi V.J., Shaw E., Distefano J.F. et al.// Biochem.J. 1983. Vol.211. P.695-700.
- Cook K.S., Groves D.L., Min H.Y., Spiegelman B.M.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1985. Vol.82. P.6480-6484.
- Min H.Y., Spiegelman B.M.// Nucl.Acids Res. 1986. Vol.14. P.8879-8892.
- Riekknen P.J., Ekfors T.O., Hopen V.K.// Biochim. et biophys. acta. 1966. Vol.118. P.604-620.
- Levy M., Fishman L., Schenkein I.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.672-681.
- Bothwell M.A., Wilson W.H., Shooter E.H.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.7287-7294.
- Ikeno K., Ikeno T., Kuzuya H., Ishiguro I.// J.Biochem. 1986. Vol.99. P.1219-1226.
- Kato H., Nakantshi E., Enjyoji K.-I. et al.// Ibid. 1987. Vol.102. P. 1389-1404.
- Ashley P.L., McDonald R.J.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.4512-4520.
- Thibault G., Genest J.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.660. P. 23-29.

- Shal S.-Y., Woodley-Miller C., Chao J., Chao L.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.5334-5343.
- Porter R.R., Reid K.B.M.// Adv.Protein Chem. 1979. Vol.33. P.1-71.
- Arland G.J., Villiers Ch.L., Chesne S., Colomb M.G.// Biochim. et biophys.acta. 1980. Vol.616. P.116-129.
- Muller-Eberhard H.J.// Annu.Rev.Biochem. 1988. Vol.57. P.321-347.
- Arland G.J., Gagnon J.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.1758-1764.
- Leytus S.P., Kurachi K., Sakarrassen K.S., Daulte E.W.// Ibid. 1986. Vol.25. P.4855-4863.
- Arland G.J., Reboul A., Meyer Ch.M., Colomb M.G.// Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol.485. P.215-226.
- Porter R.R., Stm R.B., Reid K.B.M. et al.// Meth.Enzymol. 1981. Vol. 80. P.3-153.
- Stm R.B., Porter R.R., Reid K.B.M., Gtgit J.// Biochem.J. 1977. Vol. 163. P.219-227.
- Carter P.E., Dunbar B., Fothergill J.E.// Ibid. 1983. Vol.215. P.565-571.
- Thielsen N.M., Villiers M.-B., Reboul A. et al.// FEBS Lett.1982. Vol. 141. P.19-24.
- Sottrup-Jensen L., Stepanik T.M., Kristensen T. et al.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P.9-13.
- Bentley D.R.// Biochem.J. 1986. Vol.239. P.339-345.
- Goldberger G., Bruns G.Ap., Rits M. et al.// J.Biol.Chem. 1987. Vol. 262. P.10065-10071.
- Davis A.E.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1980. Vol.77. P.4938-4942.
- Johnson D.M.A., Gagnon J., Reid K.B.M.// Biochem.J. 1980. Vol.187. P. 863-874.
- Campbell D., Porter R.R.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1983. Vol.80. P. 4464-4468.
- Niemann M.A., Bhow A.S., Bennett J.C., Volanakis J.E.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.2482-2486.
- Johnson D.M.A., Gagnon J., Reid K.B.M.// FEBS Lett. 1984. Vol.166. P. 347-351.
- Mole J.E., Niemann M.A.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.8472-8476.
- De Bruijn M.H.L., Fey G.H.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P. 708-712.
- Hammer C.H., Wirtz G.H., Renfer L. et al.// J.Biol.Chem. 1981. Vol. 256. P.3995-4006.
- Lamberts J.D., Muller-Eberhard H.J.// Ibid. 1984. Vol.259. P.12685-12690.
- Moehle C.M., Tizard R., Lemmon S.K. et al.// Mol.Cell.Biol. 1987. Vol. 7. P.4390-4399.
- Sanada Y., Fujishiro K., Tanaka H., Katunuma N.// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. Vol.86. P.815-821.
- Fujishiro K., Sanada Y., Tanaka H., Katunuma N.// J.Biochem. 1980. Vol.87. P.1321-1326.
- Kominami E., Hoffschulte H., Holzer H.// Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol.661. P.124-135.
- Farley P.C., Shepherd M.G., Sullivan P.A.// Biochem.J. 1986. Vol.236. P.177-184.
- Semeeckens S.P., Steiner D.F.// J.Biol.Chem. 1990. Vol.265. P.2997-3000.
- Wagner J.C., Escher C., Wolf D.H.// FEBS Lett. 1987. Vol.218. P.31-34.
- Mizuno K., Nakamura T., Ohshima T. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. Vol.159. P.305-311.
- Fuller R.S., Brake A., Thorner J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1989. Vol. 86. P.1434-1438.
- Mizuno K., Nakamura T., Ohshima T. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. Vol.156. P.246-254.
- Leclercy A., Boulard Ch., Kell B.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.101. P.385-393.
- Leclercy A., Gilles A.M., de Wolf A., Kell B.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.7546-7551.
- Masaki T., Tanabe M., Nakamura K., Soejima M.// Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol.660. P.44-50.
- Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. Vol.92. P.396-402.
- Teunasaawa S., Masaki T., Hirose M. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol. 264. P.3832-3839.
- Elliot B.W., Cohen C.// Ibid. 1986. Vol.261. P.11259-11265.
- Allen R.J., Scott G.K.// Intern.J.Biochem. 1983. Vol.15. P.151-154.

- Левянт М.Н., Былинкина В.С., Трудомолова М.Г., Орехович В.Н.// Биохимия. 1975. Т.40. С.1322-1324.
- Langer J., Ansoorge S., Bohley P. et al.// Acta biol. et med. germ. 1977. Vol.36. P.1729-1733.
- Langer J., Korant B.D.// Abstr.Pap. 4th Symp.Intracell.Protein Catabolism. Halle (DDR), 1981. P.129.
- Podor E.J.B., Ako H., Walsh K.A.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.4923-4927.
- Carroll E.J.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.343-354.
- Urch U.A., Hedrick J.L.// Arch.Biochem. and Biophys. 1981. Vol.206. P. 424-431.
- Lepage T., Gache Ch.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.4787-4793.
- Saklatvala J., Bond J.S., Barrett A.J.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P. 251-259.
- Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1981. Vol.78. P.4728-4732.
- Chung C.H., Goldberg A.L.// Ibid. P.4931-4935.
- Larimore F.S., Waxman L., Goldberg A.L.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.4187-4195.
- Америк А.Ю., Чистякова А.Г., Остроумова Н.И. и др.// Биооргани.химия. 1988. Т.14. С.408-411.
- Chin D.T., Goff S.A., Webster Th. et al.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.11718-11728.
- Hwang B.J., Park W.J., Chung C.H., Goldberg A.L.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.5550-5554.
- Hwang B.J., Woo K.M., Goldberg A.L., Chung Ch.H.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.8727-8734.
- Katayama Y., Gottesman S., Pumphrey J. et al.// Ibid. P.15226-15236.
- Swamy K.H.S., Chung C.H., Goldberg A.L.// Arch. Biochem. and Biophys. 1983. Vol.224. P.543-554.
- Dahlmann D., Kopp F., Kuehn L. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol.251. P. 125-131.
- Ishihara S., Sugita H.// J.Biochem. 1986. Vol.100. P.753-763.
- Tanaka K., Yoshimura T., Kumatori A. et al.// J.Biol.Chem. 1988. Vol. 263. P.16209-16217.
- Tanaka K., Ichihara A.// FEBS Lett. 1988. Vol.236. P.159-162.
- Saitoh Y., Yokosawa H., Takahashi K., Ishii S.-I.// J.Biochem. 1989. Vol.105. P.254-260.
- Fujiwara T., Tanaka K., Kumatori A. et al.// Biochemistry. 1989. Vol. 28. P.7332-7340.
- Kumatori A., Tanaka K., Tamura T. et al.// FEBS Lett. 1990. Vol. 264. P.279-282.
- Tanaka K., Fujiwara T., Kumatori A. et al.// Biochemistry. 1990. Vol. 29. P.3777-3785.
- Gottesman S., Squires C., Pichersky E. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1990. Vol.87. P.3513-3517.
- Watabe Sh., Kimura T.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.5511-5517.
- Desautels M., Goldberg A.L.// Ibid. 1982. Vol.257. P.11673-11679.
- Fried V.A., Smith H.T., Hildebrandt E., Wetner K.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.3685-3689.
- Poe M., Wu J.K., Florance J.R. et al.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P. 2209-2216.
- Pirkle H., Theodor I., Miyada D., Simmons G.// Ibid. 1986. Vol.261. P. 8830-8835.
- Lynn K.R., Clevette-Radford N.A.// Phytochemistry. 1985. Vol.24. P. 2843-2845.
- Lynn K.R., Clevette-Radford N.A.// Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol.746. P.154-159.
- Aducci P., Ascenzi P., Pierini M., Ballio A.// Plant Physiol. 1986. Vol.81. P.812-818.
- Cromlish J.A., Seidah N.G., Chretien M.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.10850-10858.
- Cromlish J.A., Seidah N.G., Chretien M.// Ibid. P.10859-10870.
- Leytus S.P., Loeb K.R., Hayen F.S. et al.// Biochemistry. 1988. Vol. 27. P.1067-1074.
- Ziefeln J.B., Graham R.M., Dreskin S.W. et al.// Ibid. 1987. Vol.26. P.8690-8697.
- Beynon R.J., Kay J.// Ibid. 1978. Vol.17. P.291-298.
- Beinfeld M.C., Bourdats J., Kuks P. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol. 264. P.4460-4465.
- Saitoh M., Yokosawa H., Ishii S.-I.// J.Biochem. 1988. Vol.103. P.493-

- 498.
633. Silberring J., Nyberg F.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.11082-11086.
634. Charriaut-Marlangue Ch., Barel M., Frade R.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1986. Vol.140. P.1113-1120.
635. Kohle D., Kausse H.// Biochim. et biophys.acta. 1984. Vol.799. P.59-67.
636. Hagiwara H., Miyazaki K., Matuo Y. et al.// Ibid. 1981. Vol.660. P.73-82.
637. Tsurugi K., Ogata K.// J.Biochem. 1982. Vol.92. P.1369-1381.
638. Wilson W.H., Shooter E.M.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.6002-6009.
639. Thomas K.A., Baglan N.C., Bradshaw R.A.// Ibid. 1981. Vol.256. P.9156-9166.
640. Taylor J.M., Mitchell W.M., Cohen S.// Ibid. 1974. Vol.249. P.2188-2194.
641. Lundren S., Ronne H., Rask L., Peterson P.A.// Ibid. 1984. Vol.259. P.7780-7784.
642. Legrand Y., Pignaud G., Caen J.P.// FEBS Lett. 1977. Vol.76. P.294-298.
643. Hatcher V.B., Lazarus G.S., Levine N. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol.483. P.160-171.
644. Orlowski M., Flick M.R., Rand J., Lesser M.// Arch. Biochem. and Biophys. 1987. Vol.254. P.156-169.
645. Zwizinski C., Wickner W.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.7973-7977.
646. Wolfe P.B., Wickner W., Goodman J.M.// Ibid. 1983. Vol.258. P.12073-12080.
647. Greenburg G., Shelness G.S., Blobel G.// Ibid. 1989. Vol.264. P.15762-15765.
648. Innis M.A., Tokunaga M., Williams M.E. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1984. Vol.81. P.3708-3712.
649. Yu F., Yamada H., Datsima K., Mizushima S.// FEBS Lett. 1984. Vol. 173. P.264-268.
650. McEntee K., Hesse J.E., Epstein W.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1976. Vol. 73. P.3979-3983.
651. Roberts J.W., Roberts C.W., Craig N.L.// Ibid. 1978. Vol.75. P.4714-4718.
652. Horii T., Ogawa T., Ogawa H.// Ibid. 1980. Vol.77. P.313-317.
653. Chatterjee P.K., Flint S.J.// Ibid. 1987. Vol.84. P.714-718.
654. Krausseltch H.-G., Wimmer E.// Annu.Rev.Biochem. 1988. Vol.57. P.701-754.
655. Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Blinov V.M., Donchenko A.P.// FEBS Lett. 1988. Vol.236. P.287-290.
656. Bazan J.F., Fletterick R.J.// Ibid. 1989. Vol.249. P.5-7.
657. Boege U., Wengler G., Wengler Gerd, Wittman-Liebold B.// Virology. 1981. Vol.113. P.293-303.
658. Wriston J.C., Yellin T.O.// Adv.Enzymol. 1973. Vol.39. P.185-248.
659. Jennings M.P., Beacham I.R.// J.Bacteriol. 1990. Vol.172. P.1491-1498.
660. Matita T., Matsuda G.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1980. Vol. 361. P.105-117.
661. Tosa T., Sano R., Yamamoto K. et al.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P. 1075-1079.
662. Yonet M., Mitsui Y., Itaka Y.// J.Mol.Biol. 1977. Vol.110. P.179-186.
663. Davidson L., Burcom M., Ahn S. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol.480. P.282-294.
664. Dunlop P.C., Meyer G.M., Ban D., Roon R.J.// J.Biol.Chem. 1978. Vol. 253. P.1297-1304.
665. Dunlop P.C., Meyer G.M., Roon R.J.// Ibid. 1980. Vol.255. P.1542-1546.
666. Cole M.// Nature. 1964. Vol.203. P.519-520.
667. Kutzbach C., Rauenbusch E.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1974. Vol.355. P.45-53.
668. Chiang C., Bennett R.E.// J.Bacteriol. 1967. Vol.93. P.302-308.
669. Furth A.J.// Biochim. et biophys.acta. 1975. Vol.377. P.431-443.
670. Fisher J.P., Knowles J.R.// Annu.Rep.Med.Chem. 1978. Vol.13. P.239-248.
671. Knott-Hunziker V., Redhead K., Petursson S., Waley S.G.// FEBS Lett. 1980. Vol.121. P.8-10.
672. Duez C., Frère J.-M., Klein D. et al.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P. 75-82.
673. Mézes P.S.F., Yang Y.Q., Hussain M., Lampen J.O.// FEBS Lett. 1983. Vol.161. P.195-200.
674. Dale J.W., Godwin D., Mossakowska D. et al.// Ibid. 1985. Vol.191. P. 39-44.
675. Joris B., De Meester F., Gallent M. et al.// Biochem.J. 1986. Vol.239.

- P.581-586.
 Jaurin B., Grundstrom T.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1981. Vol.78. P. 4897-4901.
 Yoshimoto T., Saeki T., Tsuru D.// J.Biochem. 1983. Vol.93. P.469-477.
 Yoshimoto T., Tsuru D.// Ibid. 1985. Vol.97. P.1477-1485.
 Ninomiya K., Kawatani K., Tanaka S. et al.// Ibid. 1982. Vol.92. P. 413-421.
 Mantle D., Lauffart B., McDermott J.R. et al.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.147. P.307-312.
 Makinen K.K., Makinen P.-L.// Biochem.J. 1978. Vol.175. P.1051-1067.
 Kawata S., Takayama S., Ninomiya K., Maksumi S.// J.Biochem. 1980. Vol.88. P.1025-1032.
 Hiraiwa B.Y., Fukasawa K., Harada M.// Ibid. 1983. Vol.94. P.1201-1208.
 Sebt S.M., Mignano J.E., Jant J.P. et al.// Biochemistry. 1989. Vol. 28. P.6544-6548.
 Чулюкова Т.М., Орехович В.Н. // Биохимия. 1982. Т.47. С.1091-1095.
 Morgan J.G., Donlon J.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.146. P.429-435.
 Endo F., Tanoue A., Nakai H. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P. 4476-4481.
 Davis N.C., Smith E.L.// Ibid. 1957. Vol.224. P.261-275.
 Yoshimoto T., Matsubara P., Kawano E., Tsuru D.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P.1889-1896.
 Browne P., O'Cuinn G.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.6147-6154.
 Haley E.E.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.737-741.
 Haley E.E.// Ibid. P.730-737.
 Haley E.E.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.5748-5752.
 Bouma J.M.W., Scheper A., Duurema A., Gruber H.// Biochim. et biophys. acta. 1976. Vol.444. P.853-862.
 McDonald J.K., Callahan P.X., Ellis S.// Meth.Enzymol. 1972. Vol.25. P.272-281.
 Lynn K.R., Labow R.S.// Canad.J.Biochem.Cell.Biol. 1985. Vol.62. P. 1301-1308.
 Hui K-S.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.6613-6618.
 Dunn N.W., McQuillan H.T.// Biochim. et biophys.acta. 1971. Vol.235. P.149-158.
 Tamura T., Imal Y., Strominger J.L.// J.Biol.Chem. 1976. Vol.251. P. 414-423.
 Ninjoor V., Taylor S.L., Tappel A.A.// Biochim. et biophys.acta. 1974. Vol.370. P.308-321.
 Lones M., Chatterjee R., Singh H., Kalnitsky G.// Arch. Biochem. and Biophys. 1983. Vol.221. P.64-78.
 Lipperheide C., Otto K.// Biochim. et biophys.acta. 1986. Vol.880. P. 171-178.
 Szeewczuk A., Kwiatkowska J.// Europ.J.Biochem. 1970. Vol.15. P.92-96.
 Bauer K., Nowak P., Klein Kauf H.// Ibid. 1981. Vol.118. P.173-176.
 Doolittle R.F., Armentrout R.W.// Biochemistry. 1968. Vol.7. P.516-521.
 Doolittle R.F.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.555-569.
 Tsuru D., Fujiwara K., Kado K.// J.Biochem. 1978. Vol.84. P.467-476.
 Fujiwara K., Kitagawa T., Tsuru D.// Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol.658. P.10-16.
 Barrett A.J.// Biochem.J. 1973. Vol.131. P.809-822.
 Ritonja A., Popovic T., Turk V. et al.// FEBS Lett. 1985. Vol.181. P. 169-172.
 Chan S.J., San Segundo B., McCormick M.B., Steiner D.F.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1986. Vol.83. P.7721-7725.
 Fong D., Calhoun D.H., Hsieh W-T. et al.// Ibid. P.2909-2913.
 Suhar A., Marks N.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.101. P.23-30.
 MacGregor R.R., Hamilton J.W., Shofstall R.E., Cohn D.V.// J. Biol. Chem. 1979. Vol.254. P.4423-4427.
 Towatari T., Kawabata Y., Katunuma N.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol. 102. P.279-289.
 Olstein A.D., Litner I.E.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.11049-11056.
 Takahashi T., Dehdarani A.H., Schmidt P.G., Tang J.// Ibid. 1984. Vol. 259. P.9874-9882.
 Takahashi T., Yonezawa S., Dehdarani A.H., Tang J.// Ibid. 1986. Vol. 261. P.9368-9374.
 Mort J.S., Leduc H.S., Recklies A.D.// Biochim. et biophys.acta. 1983. Vol.755. P.369-375.
 Takio K., Towatari T., Katunuma N., Titani K.// Biochem. and Biophys.

- Res. Commun. 1980. Vol. 97. P. 340-346.
- Takio K., Towatari T., Katunuma N. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. Vol. 80. P. 3666-3670.
- Gay N.J., Walker J.E. // Biochem. J. 1985. Vol. 225. P. 707-712.
- Meloun B., Baudys M., Pohl J. et al. // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 9087-9093.
- Wada K., Tanabe T. // J. Biochem. 1988. Vol. 104. P. 472-476.
- Blumberg S., Schechter I., Berger A. // Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 15. P. 97-102.
- Husain S.S., Lowe Y. // Biochem. J. 1969. Vol. 114. P. 279-288.
- Itener J.E., Friedenson B. // Meth. Enzymol. 1970. Vol. 19. P. 261-273.
- Husain S.S., Lowe G. // Biochem. J. 1970. Vol. 117. P. 333-340.
- Mettrone R.M., Johnston R.B., Seng R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1967. Vol. 122. P. 137-143.
- Murachi T. // Meth. Enzymol. 1976. Vol. 45, Pt. B. P. 475-485.
- Ota S., Muta E., Katahira Y., Okamoto Y. // J. Biochem. 1985. Vol. 98. P. 219-228.
- Rittonja A., Rowan A.D., Buttle D.J. et al. // FEBS Lett. 1989. Vol. 247. P. 419-424.
- Pal G., Sinha N.K. // Arch. Biochem. and Biophys. 1980. Vol. 202. P. 321-329.
- Rowan A.D., Buttle D.J., Barrett A.J. // Ibid. 1988. Vol. 267. P. 262-270.
- Watson D.C., Yaguchi M., Lynn K.R. // Biochem. J. 1990. Vol. 266. P. 75-81.
- Glazer A.N., Smith E.L. // The enzymes. 3rd ed. / Ed. P. Boyer. N.Y.; L.: Acad. press, 1971. Vol. 3. P. 501-546.
- Bainje B.S., Brocklehurst K. // Biochem. J. 1974. Vol. 177. P. 541-548.
- Polgar L. // Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol. 658. P. 262-269.
- Khan I.U., Polgar L. // Ibid. 1983. Vol. 760. P. 350-356.
- Lynn K.R. // Ibid. 1979. Vol. 569. P. 193-201.
- Dubois T., Kleinschmidt T., Schnek A.G. et al. // Biol. Chem. Hoppe-Seylers. 1988. Vol. 369. P. 741-754.
- Buttle D.J., Kumbhavi A.A., Sharp S.L. et al. // Biochem. J. 1989. Vol. 261. P. 469-476.
- Gilles A.-M., Imhoff J.-M., Kell B. // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 1462-1468.
- Gilles A.-M., Lecrotsey A., Kell B. // Europ. J. Biochem. 1984. Vol. 145. P. 469-476.
- Liu T.-Y., Neumann N.P., Elliott S.D. et al. // J. Biol. Chem. 1963. Vol. 238. P. 251-256.
- Liu T.-Y., Elliott S.D. // The enzymes. 3rd ed. / Ed. P. Boyer. N.Y.; L.: Acad. press, 1971. Vol. 3. P. 609-647.
- Tal J.Y., Korit A.A., Liu T.-Y., Elliott S.D. // J. Biol. Chem. 1976. Vol. 251. P. 1955-1959.
- Silink M., Reddel R., Bethel M., Rowe P.B. // Ibid. 1975. Vol. 250. P. 5982-5994.
- Saint P.K., Rosenberg T.H. // Ibid. 1974. Vol. 249. P. 5131-5134.
- Eisenhans B., Ahmad O., Rosenberg T.H. // Ibid. 1984. Vol. 259. P. 6364-6368.
- McDowall M.A. // Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 14. P. 214-221.
- Carne A., Moore C.H. // Biochem. J. 1978. Vol. 173. P. 73-83.
- Mason R.W., Green G.D.J., Barrett A.J. // Ibid. 1985. Vol. 226. P. 233-242.
- Rittonja A., Popovic T., Kotnik M. et al. // FEBS Lett. 1988. Vol. 228. P. 341-345.
- Kirschke H., Langner J., Wiederanders B. et al. // Europ. J. Biochem. 1977. Vol. 74. P. 293-301.
- Okitani A., Matsukura U., Kato H., Fujimaki M. // J. Biochem. 1980. Vol. 87. P. 1133-1143.
- Mason R.W., Taylor M.A.J., Etherington D.J. // FEBS Lett. 1982. Vol. 146. P. 33-36.
- Bando Y., Kominami E., Katunuma N. // J. Biochem. 1986. Vol. 100. P. 35-42.
- Wada K., Takai T., Tanabe T. // Europ. J. Biochem. 1987. Vol. 167. P. 13-18.
- Dufour E., Obled A., Valin Ch. et al. // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 5689-5695.
- Towatari T., Katunuma N. // FEBS Lett. 1988. Vol. 236. P. 57-61.
- Tanaka K., Ikegaki N., Ichihara A. // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 5937-5944.

- Singh H., Kalnitsky G.// Ibid. 1978. Vol.253. P.4319-4326.
- Schwartz W.N., Barrett A.J.// Biochem.J. 1980. Vol.191. P.487-497.
- Ishidoh K., Komnani E., Katunuma N., Suzuki K.// FEBS Lett. 1989. Vol.253. P.103-107.
- Whellock M.J.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.12471-12474.
- Yoshimura N., Kikuchi T., Sasaki T. et al.// Ibid. 1983. Vol.258. P.8883-8889.
- Malik M.N., Fenko M.D., Igbal K., Wientewski H.M.// Ibid. P.8955-8962.
- Pontremoli S., Melloni E., Salamino F. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1984. Vol.81. P.53-56.
- Kitahara A., Sasaki T., Kikuchi T. et al.// J.Biochem. 1984. Vol.95. P.1759-1766.
- Sortmasht H., Imafoh-Ohmi S., Emori Y. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.20106-20111.
- Ohno S., Emori Y., Imafoh S. et al.// Nature. 1984. Vol.312. P.566-570.
- Aoki K., Imafoh S., Ohno S. et al.// FEBS Lett. 1986. Vol.205. P.313-317.
- Malik M.N., Fenko M.D., Shetkh A.M. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1987. Vol.916. P.135-144.
- Mizutani S., Sumi S., Suzuki O. et al.// Ibid. 1984. Vol.786. P.113-117.
- Алексеев Л.И., Золотов Н.Н., Орехович В.Н.// Биооргани.химия 1976. Т. 2. С.942-949.
- Mizuno K., Miyata A., Kangawa K., Matsuo H.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1982. Vol.108. P.1235-1242.
- Devil L., Goldstein A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1984. Vol.81. P.1892-1896.
- Achstetter T., Ehmann C., Osaki A., Wolf D.H.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.13344-13348.
- Achstetter T., Ehmann C., Wolf D.H.// Ibid. 1985. Vol.260. P.4585-4590.
- Portnoy D.A., Erickson A.H., Kochan J. et al.// Ibid. 1986. Vol.261. P.14697-14703.
- Evans P., Etherington D.J.// Europ.J.Biochem. 1978. Vol.83. P.87-97.
- Evans P.// FEBS Lett. 1979. Vol.99. P.55-58.
- Kirschke H., Loontjens P., Turk V.// Ibid. 1984. Vol.174. P.123-127.
- Kirschke H., Schmidt I., Wiederanders B.// Biochem.J. 1986. Vol.240. P.455-459.
- Gohda E., Pittot H.C.// J.Biol.Chem. 1981. Vol.256. P.2567-2572.
- Gohda E., Pittot H.C.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.659. P.114-122.
- Itao J.C.R., Lenney J.F.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1984. Vol. 124. P.909-916.
- Rogers J.C., Dean D., Heck G.R.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P.6512-6516.
- Kageyama T., Takahashi S.Y., Takahashi K.// J.Biochem. 1981. Vol.90. P.665-671.
- Hayashi H.// Intern.Rev.Cytol. 1975. Vol.40. P.101-151.
- Shroyer L.A., Varadant P.T.// Arch.Biochem. and Biophys. 1985. Vol. 236. P.205-219.
- McKenzie R.A., Burghen G.A.// Ibid. 1984. Vol.229. P.604-611.
- Palanga A., Gordon S.G.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.5558-5567.
- Darby N.J., Smyth D.G.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1988. Vol. 153. P.1193-1200.
- Molla A., Yamamoto T., Maeda H.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.616-621.
- Gustafson G.L., Thon L.A.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.12471-12478.
- Williams J.G., North M.J., Mahbubani H.// EMBO J. 1985. Vol.4. P.999-1006.
- Busconi L., Folco E.J., Martone C. et al.// FEBS Lett. 1984. Vol.176. P.211-214.
- Nordwig A.// Adv.Enzymol. 1971. Vol.34. P.155-205.
- Awanikumar S., Radhakrishnan A.N.// Biochim. et biophys. acta. 1975. Vol.384. P.194-202.
- Morales T.T., Woloszew J.F.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.4855-4860.
- Tislar U., Barrett A.J.// Arch.Biochem. and Biophys. 1989. Vol.274. P.138-144.
- Tislar U., De Camargo A.C.M., Da Costa C.A., Barrett A.J.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1989. Vol.162. P.1460-1464.
- Wilk S., Pearce S., Orłowski M.// Life Sci. 1979. Vol.24. P.457-464.
- Okita A., Nishimura T., Kato H.// Europ.J.Biochem. 1981. Vol.115. P.

269-274.

Shinagawa T., Do Y.S., Baxter J.D.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1990. Vol. 87. P.1927-1931.

Ismail F., Gevers W.// Biochim. et biophys.acta. 1983. Vol.742. P.399-408.

Rivett A.J.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.12600-12606.

McGulre M.J., de Martino G.N.// Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 873. P.279-289.

Zolfaghari R., Baker C.R.F., Amirgholami A. et al.// Arch.Biochem. and Biophys. 1987. Vol.258. P.42-50.

McGulre M.J., McCullough M.L., Croall D.E., De Martino G.N.// Biochim. et biophys.acta. 1989. Vol.995. P.181-186.

McGulre M.J., Croall D.E., de Martino G.N.// Arch. Biochem. and Biophys. 1988. Vol.262. P.273-285.

Wazman L., Fagan J.M., Tanaka K., Goldberg A.L.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.11994-12000.

Bazan J.F., Fletterick R.J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1988. Vol.85. P. 7872-7876.

Gorbalenya A.E., Donchenko A.P., Blinov V.M., Koonin E.V.// FEBS Lett. 1989. Vol.243. P.103-114.

Горбаленя А.Е., Свисткин Ю.В.// Биохимия. 1983. Т.48. С.442-453.

Kontz H., Rosenwirth B.// J.Virol. 1988. Vol.62. P.1243-1250.

Hardy W.R., Strauss J.H.// Ibid. 1989. Vol.63. P.4653-4664.

Kordel W., Schneider F.// Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol.Chem. 1975. Vol.356. P.915-920.

Kordel W., Schneider F.// Biochim. et biophys.acta. 1976. Vol.445. P. 446-457.

Reitz M.S., Rodwell V.W.// J.Biol.Chem. 1970. Vol.245. P.3091-3096.

Broom M.F., Sherriff R.M., Tate W.P. et al.// Biochem.J. 1989. Vol. 257. P.51-56.

Imai T.// J.Biochem. 1973. Vol.73. P.139-153.

Kikuchi M., Sakaguchi K.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.485-492.

Fukuda H., Iwade S., Klmura A.// J.Biochem. 1982. Vol.91. P.1731-1738.

Matsumoto J., Nagai S.// Ibid. 1972. Vol.72. P.269-279.

Schmid P.C., Zuzarte-Augustin M.L., Schmid H.H.O.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.14145-14149.

Osada H., Isono K.// Biochem.J. 1986. Vol.233. P.459-463.

Tang J.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.406-421.

Roberts N.B., Taylor W.H.// Biochem.J. 1978. Vol.169. P.607-615.

Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., Mizukami Y., Ichihara Y.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.5306-5311.

Athauda S.B.P., Tanji M., Kageyama T., Takahasht K.// J.Biochem. 1989. Vol.106. P.920-927.

Ryle A.P.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.316-336.

Furthata C., Saito D., Fujiki H. et al.// Europ.J.Biochem. 1980. Vol. 105. P.43-50.

Степанов В.М., Лавренива Г.И., Руденская Г.И. и др.// Биохимия. 1976. Т.41. С.1285-1290.

Harboe M.K., Andersen P.M., Poltmann B. et al.// J.Biol.Chem. 1974. Vol.249. P.4487-4494.

Sepulveda P., Marciniak J., Liu D., Tang J.// Ibid. 1975. Vol.250. P.5082-5088.

Kageyama T., Moriyama A., Takahasht K.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P. 1557-1567.

Kageyama T., Takahasht K.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.4395-4405.

Ichihara T., Ichihara Y., Hayano T. et al.// Ibid. 1989. Vol.264. P. 10193-10199.

Merrett T.R., Bar-Eli E., van Vunakis H.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.3696-3702.

Bohak Z.// J.Biol.Chem. 1969. Vol.244. P.4638-4648.

Bohak Z.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.347-363.

Baudys M., Kostka V.// Europ.J.Biochem. 1983. Vol.136. P.89-99.

Taggart R.T., Cass L.G., Mohandas T.K. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.375-379.

Ryle A.P., Hamilton M.P.// Biochem.J. 1966. Vol.101. P.176-183.

Ichihara Y., Sogawa K., Morohashi K. et al.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.161. P.7-12.

Minamitani N., Ito K., Kobayashi M. et al.// J.Biochem. 1984. Vol.96. P.1061-1069.

Poltmann B.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.421-436.

- Foltmann B., Pedersen V.B., Kauffman D., Wybrandt G.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.8447-8456.
- Danley D.E., Geoghegan K.F.// Ibid. 1988. Vol.263. P.9785-9789.
- Jensen T., Azelsen N.H., Foltmann B.// Biochim.et biophys. acta. 1982 Vol.705. P.249-256.
- Barrett A.J.// Adv.Exp.Biol. and Med. 1977. Vol.95. P.291-299.
- Faust P.L., Kornfeld S., Chirgwin J.M.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P.4910-4914.
- Huang J.S., Huang S.S., Tang J.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.11405-11417.
- Yamamoto K., Katsuda N., Himeno M., Kato K.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.95. P.459-467.
- Бархударян Н.А., Аюкян Т.Н., Галоян А.А.// Биохимия. 1980. Т.45. С. 1293-1297.
- Oikawa T., Iwaguchi T.// Chem. and Pharm.Bull. 1984. Vol.32. P.5059-5063.
- Figueiredo A.F.S., Takit Y., Tsuji H. et al.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.5476-5481.
- Takahashi T., Tang J.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.6435-6443.
- Shewale J.G., Tang J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1984. Vol.81. P.3703-3707.
- Muto N., Tani S.// Biochim. et biophys.acta. 1985. Vol.843. P.114-122.
- Srivastava P.N., Ninjoor V.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1982. Vol.109. P.63-69.
- Watabe S., Taguchi S., Ikeda T. et al.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.92. P. 45-55.
- Fukushima K., Gnoh G.H., Shinano S.// Agr. and Biol.Chem. 1971. Vol. 35. P.1495-1502.
- Kageyama T., Takahashi K.// J.Biochem. 1980. Vol.87. P.725-735.
- Muto N., Arat K.M., Tani S.// Biochim. et biophys.acta. 1983. Vol.745. P.61-69.
- Muto N., Yamamoto M., Tani S.// J.Biochem. 1987. Vol.101. P.1069-1075.
- Antonov V.K., Zilberman M.I., Vorotyntseva T.I.// Aspartic proteinases and their inhibitors/ Ed. V.Kostka. B.; N.Y.: de Gruyter, 1985. P.129-135.
- Roberts N.B., Taylor W.H.// Biochem.J. 1978. Vol.169. P.617-624.
- Yamamoto K., Katsuda N., Kato K.// Europ.J.Biochem. 1978. Vol.92. P. 499-508.
- Yamamoto K., Ueno E., Uemura H., Kato Y.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. Vol.148. P.267-272.
- Yonezawa S., Tanaka T., Miyauchi T.// Arch.Biochem. and Biophys. 1987 Vol.256. P.499-508.
- Azuma T., Pals G., Mohandas T.K. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.16748-16753.
- Ruenwongsa P., Chulavatnatol M.// Adv.Exp.Biol. and Med. 1977. Vol.95. P.329-341.
- Afting E.-G., Becker M.-L.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1979. Vol.360. P.222.
- Лобарева Л.С., Степанов В.М.// Успехи биол. химии. 1978. Т.19. С.83-105.
- Davidson R., Gertler A., Hofmann Th.// Biochem.J. 1975. Vol.147. P.45-53.
- Tanaka N., Takeuchi M., Ichihama E.// Biochim. et biophys.acta. 1977. Vol.485. P.406-416.
- Kovaleva G.G., Shitanskaya M.P., Stepanov V.M.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1972. Vol.49. P.1075-1081.
- Kovaleva G.G., Neutsova E.R., Syrova I.A. et al.// Abstr.FEBS Spec. Meet.on Enzymes. Dubrovnik-Cavtat, 1979. S3. P.53.
- Kumagai I., Yamasaki M., Ut N.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol. 659. P.334-343.
- Sodek J., Hofmann T.// Canad.J.Biochem. 1970. Vol.48. P.1014-1016.
- Cunningham A., Wang H.-M., Jones S.R. et al.// Ibid. 1976. Vol.54. P. 902-914.
- Houmad J., Raymond H. N.// Biochemie. 1979. Vol.61. P.979-982.
- Graham J.E.S., Sodek J., Hofmann T.// Canad.J.Biochem. 1973. Vol.51. P. 789-796.
- Delaney R., Wong R.N.S., Meng G.-Z. et al.// J.Biol.Chem. 1987. Vol. 262. P.1461-1467.
- Takahashi K.// Ibid. P.1468-1478.
- Takahashi K.// J.Biochem. 1988. Vol.103. P.162-167.
- Horiuchi H., Yamai K., Okuzaki T. et al.// J.Bacteriol. 1988.

- Vol.170. P.272-278.
892. Holzer H., Bunning P., Neussdoerffer F.// Adv.Exp.Biol. and Med. 1977. Vol.95. P.271-289.
 893. Neussdoerffer F., Tortora P., Holzer H.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.12087-12093.
 894. Magni G., Natalini P., Santarelli I., Vita A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1982. Vol.213. P.426-433.
 895. Dreyer T., Haikier B., Svendsen I., Ottesen M.// Carlsberg Res.Comm. 1986. Vol.51. P.27-41.
 896. Rucher R.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.659. P.99-113.
 897. Hagemeyer K., Fawwal I., Whitaker J.R.// J.Dairy Sci. 1968. Vol.51. P. 1916-1922.
 898. Barkholt V.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.167. P.327-338.
 899. Ottesen M., Rickert W.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.459-460.
 900. Beck A.// Neth.Milk Dairy. 1981. Vol.35. P.275-280.
 901. Tonouchi N., Shoun H., Uozumi T., Beppu T.// Nucl.Acids Res. 1986. Vol.14. P.7557-7568.
 902. Baudys M., Foundling S., Pavlik M. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol.235. P.271-274.
 903. Carlos J.-R., Raingeaud J., Mazaud C. et al.// Ibid. 1990. Vol.262. P. 97-100.
 904. Гайда А.В., Остерман А.Л., Руденская Г.Н., Степанов В.М.// Биохимия. 1981. Т.46. С.181-189.
 905. Lin X.-l., Tang J.// J.Biol.Chem. 1990. Vol.265. P.1490-1495.
 906. Dickle N., Ltener I.E.// Biochim. et biophys.acta. 1962. Vol.64. P.41-51.
 907. Levy M.R., Chou S.C.// Ibid. 1974. Vol.334. P.423-430.
 908. Руденская Г.Н., Гайда А.В., Степанов В.М.// Биохимия. 1980. Т.45. С. 561-568.
 909. Oda K., Murao S.// Agr. and Biol.Chem. 1974. Vol.38. P.2435-2444.
 910. Northara K., Tsuzuki H., Murao S., Oda K.// J.Biochem. 1979. Vol.85. P.661-668.
 911. Malta T., Nagata S., Matsuda G. et al.// Ibid. 1984. Vol.95. P.465-475.
 912. McKay V.L., Welch S.K., Insley M.T. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1988. Vol.85. P.55-59.
 913. Smith G.D., Murray M.A., Nichol L.W., Trikojus V.M.// Biochim. et biophys.acta. 1969. Vol.171. P.288-298.
 914. Loh Y.P., Partsh D.C., Tuteja R.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.7194-7205.
 915. Partsh D.C., Tuteja R., Altsteln M. et al.// Ibid. 1986. Vol.261. P. 14392-14397.
 916. Berlet H.H.// FEBS Lett. 1986. Vol.194. P.297-300.
 917. Amagase Sh.// J.Biochem. 1972. Vol.72. P.73-81.
 918. Shtnans S., Fukushima K.// Agr. and Biol.Chem. 1971. Vol.35. P.1488-1494.
 919. Garg G.K., Virupaksha T.K.// Europ.J.Biochem. 1970. Vol.17. P.4-12.
 920. Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е., Руденская Г.Н., Степанов В.М.// Биохимия 1984. Т.49. С.479-485.
 921. Сарбасанова Ш.Т., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е., Заиров С.З.// Там же. 1988. Т.53. С.768-775.
 922. Rodrigo I., Vera P., Conejero V.// Europ.J.Biochem. 1989. Vol.184. P. 663-669.
 923. Inagami T., Murakami K.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.2978-2983.
 924. Yokawa H., Inagami T., Hass E.// Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol.83. P.306-312.
 925. Dza V.J., Slater E.E., Haber E.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.5224-5237.
 926. Iwao H., Minami T., Ikemoto F. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Commun. 1982. Vol.106. P.933-939.
 927. Hirose Sh., Ohsawa T., Inagami T., Murakami K.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.6316-6321.
 928. Takahashi S., Ohsawa T., Miura R., Miyake Y.// J.Biochem. 1983. Vol. 93. P.265-274.
 929. Misono K.S., Chang J.-J., Inagami T.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1982. Vol.79. P.4858-4862.
 930. Miyazaki H., Fukamizu A., Hirose S. et al.// Ibid. 1984. Vol.81. P. 5999-6003.
 931. Shitagawa T., Do Y.-S., Tam H., Hsueh W.A.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1986. Vol.139. P.446-454.
 932. Holm I., Ollo R., Panthier J.-J., Rougeon F.// EMBO J. 1984. Vol.3. P.

557-562.

Pontremoli S., Salamino F., Sparatore B. et al.// Biochem.J. 1979. Vol.181. P.559-568.

Yamamoto K., Marchesi V.T.// Biochim. et biophys.acta. 1984. Vol.790. P.208-218.

Yamamoto K., Takeda M., Yamamoto H. et al.// J.Biochem. 1985. Vol.97. P.821-830.

Tarasova N.I., Szecsi P.B., Foltmann B.// Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol.880. P.96-100.

Takeda M., Ueno E., Kato Y., Yamamoto K.// J.Biochem. 1986. Vol.100. P.1269-1277.

Gardell S.J., Tate S.S.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.4942-4945.

Pearl L.H., Taylor W.R.// Nature. 1987. Vol.329. P.351-354.

Seelmeier S., Schmidt H., Turk V., Helm K.v.d.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1988. Vol.85. P.6612-6616.

Graves M.C., Lim J.J., Helmer E.P., Kramer R.A.// Ibid. P.2449-2453.

Darke P.L., Leu C-T., Davis L.J. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.2307-2312.

Nam S.H., Hatanaka M.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1986. Vol. 139. P.129-135.

Shimotohno K., Takahashi Y., Shimizu N. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1985. Vol.82. P.3101-3105.

Yoshinaka Y., Katoh I., Copeland T.D., Oroszlan S.// Ibid. P.1618-1622.

Yoshinaka Y., Katoh I., Copeland T.D. et al.// J.Virol. 1986. Vol.57. P.826-832.

Seeläček J., Šrtop P., Kaprálek F. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol.237. P.187-190.

Roberts J., Holcenberg J.S., Dolowy W.C.// J.Biol.Chem. 1972. Vol.247. P.84-90.

Tanaka S., Robinson E.A., Appella E. et al.// Ibid. 1988. Vol.263. P. 8583-8590.

Himmelfoch S.R.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.508-514.

Delange R.J., Smith E.L.// The enzymes. 3rd ed./ Ed. P.D.Boyer. N.Y.; L.: Acad.press, 1971. Vol.3. P.81-118.

Iedeme N., Hennon G., Vincent-Figuet O., Ploguet R.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.660. P.262-270.

Dounce A.L., Allen P.Z.// Arch.Biochem. and Biophys. 1987. Vol.257. P. 13-16.

Hanson H., Frohne M.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.504-521.

Oettgen H.C., Taylor A.// Anal.Biochem. 1985. Vol.146. P.238-245.

Cuyper H.Th., Loon-Klaassen L.A.H., Vree Egberts W.T.M. et al.// J. Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.7077-7085.

Metz G., Rohm K-H.// Biochim. et biophys.acta. 1976. Vol.429. P.933-949.

Chang Y-H., Smith J.A.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.6979-6983.

Machuga E.J., Ives D.H.// Biochim. et biophys.acta. 1984. Vol.789. P. 26-36.

Kim Y.S., Brophy E.J.// J.Biol.Chem. 1976. Vol.251. P.3199-3205.

Gray G.M., Santiago N.A.// Ibid. 1977. Vol.252. P.4922-4928.

Benajiba A., Marcoux S.// Europ.J.Biochem. 1980. Vol.107. P.381-388.

Feracé H., Marcoux S.// Biochim. et biophys.acta. 1980. Vol.599. P. 448-463.

Svensson B., Sjöström H., Norén O.// Europ.J.Biochem. 1982. Vol.126. P.481-488.

Olsen J., Cowell G.N., Konigshofer E. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol. 238. P.307-314.

Behal P.J., Story M.N.// Arch.Biochem. and Biophys. 1969. Vol.131. P. 74-82.

Desnuelle P.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.101. P.1-11.

Nakantani M., Moriyama A., Narita Y., Sasaki M.// J.Biochem. 1989. Vol.106. P.818-825.

Watt V.M., Yip C.C.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.5480-5487.

Wagner G.W., Tavitani M.A., Herrmann K.M., Dixon J.E.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.3884-3890.

Gros C., Gros B., Schwartz J-C.// Ibid. 1985. Vol.24. P.2179-2185.

Mantle D., Hardy M.E., Lauffart B. et al.// Biochem.J. 1983. Vol.211. P.567-573.

Jacobs-Sturm A., Dahlmann B., Reitauer H.// Biochim. et biophys. acta. 1982. Vol.715. P.34-41.

Verlinden J., van Leuven F., Casselman J.J., Berghe H.v.d.// FEBS Lett.

1981. Vol.123. P.287-290.
- Yman L.// Acta pharm.suec. 1970. Vol.7. P.75-80.
- Lalu K., Lampelo S., Vanha-Perttula T.// Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol.873. P.190-197.
- Doumenc C., Marcoux S.// Biochem.J. 1979. Vol.177. P.801-808.
- Sach L., Marks N.// Biochim. et biophys.acta. 1982. Vol.706. P.229-238.
- Nagatsu I., Nagatsu T., Yamamoto T. et al.// Ibid. 1970. Vol.198. P. 255-270.
- Lalu K., Lampelo S., Nummelin-Kortelainen M., Vanha-Perttula T. // Ibid. 1984. Vol.789, P.324-333.
- Danielsen E.M., Noren O., Sjostrom H. et al.// Biochem.J. 1980. Vol. 189. P.591-603.
- Tobe H., Kojima F., Aoyagi T., Umezawa H.// Biochim. et biophys.acta. 1980. Vol.613. P.459-468.
- Gorvel J.P., Banajitba A., Marcoux S.// Ibid. 1980. Vol.615. P.271-274.
- Maze M., Gray G.M.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.2351-2358.
- Feraoui H., Banajitba A., Gorvel J.P. et al.// Biochim. et biophys.ac-
ta. 1981. Vol.658. P.148-157.
- Чумкова Т.М., Орехович В.Н.// Биохимия. 1978. Т.43. С.964-969.
- Dehm P., Nordwig A.// Europ.J.Biochem. 1970. Vol.17. P.364-371.
- Lasch J., Koelsch R., Steinmetz T. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol.
227. P.171-174.
- Hooper N.M., Hryszko J., Turner A.J.// Biochem.J. 1990. Vol.267. P.
509-515.
- Yaron A., Berger A.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.521-534.
- Yashimoto T., Tone H., Honda T. et al.// J.Biochem. 1989. Vol.105. P.
412-416.
- Prescott J.M., Wilkes S.H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.530-
543.
- Ruffin P., van Brussel E., Biguet J., Brerke G.// Biochimie. 1979.
Vol.61. P.495-500.
- Ваганова Т.И., Иванова Н.М., Клепикова Ф.С. и др.// Биохимия. 1984.
Т.49. С.1899-1907.
- Купцова М.П., Ваганова Т.И.; Любимская Л.А., Степанов В.М.// Там же.
1985. Т.50. С.270-278.
- Spungin A., Blumberg S.// Europ.J.Biochem. 1989. Vol.183. P.471-477.
- Vosbeck K.D., Chow K.-F., Awad W.M.// J.Biol.Chem. 1973. Vol.248. P.
6029-6034.
- Miller C., Strauch K.L., Kukral A.M. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA.
1987. Vol.84. P.2718-2722.
- Wingfield P., Graber P., Turcatti G. et al.// Europ.J.Biochem. 1989.
Vol.180. P.23-32.
- Wagner F.W., Ray L.E., Ajabnoor M.A. et al.// Arch .Biochem. and Bio-
phys. 1979. Vol.197. P.63-72.
- Lazdunski C., Busuttil J., Lazdunski A.// Europ.J.Biochem. 1975. Vol.
60. P.363-369.
- McCaman M.T., Villarejo M.R.// Arch.Biochem. and Biophys. 1982. Vol.
213. P.384-394.
- Bally M., Foglino M., Bruschi M. et al.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.
155. P.565-569.
- McCaman M.T., Gabe J.D.// Mol. and Gen.Genet. 1986. Vol.204. P.148-
152.
- Coletti-Previero M.A., Mattras H., Descomps B., Previero A.// Bio-
chim. et biophys.acta. 1980. Vol.657. P.122-127.
- Traiteante L.J., Rotrosen J., Stekterski J. et al.// Life Sci. 1980.
Vol.26. P.1697-1706.
- Nyberg F., Thornwall M., Hetta J.// Biochem. and Biophys.Res. Commun.
1990. Vol.167. P.1256-1262.
- Hersh L.B.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.2345-2350.
- Hui K.-S., Wang Y.-Y., Lajtha A.// Ibid. 1983. Vol.22. P.1062-1067.
- Колесникова Е.Ф., Ротанова Т.В., Америк А.Ю. и др.// Биоорган. химия.
1989. Т.12. С.340-347.
- Roncart G., Stoll E., Zuber H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.
522-530.
- Chaputs R., Zuber H.// Ibid. 1970. Vol.19. P.552-555.
- Rabier D., Desmazland M.J.// Biochimie. 1973. Vol.55. P.389-404.
- Lee C.C.T., Markel J.R.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.661. P.
39-44.
- Markel J.R., Lee C.C.T., Freund Th.S.// Ibid. P.32-38.
- Kessler E., Yaron A.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.544-552.

- Vogt V.M.// J.Biol.Chem. 1970. Vol.245. P.4760-4769.
- Little G.H., Starnes W.L., Behal F.J.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.495-503.
- Freitas J.O., Guimarães J.A., Borges D.R., Prado J.L.// Intern.J.Biochem. 1979. Vol.10. P.81-89.
- Kohn H., Kanda S., Kanno T.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.10744-10748.
- Kawata S., Imamura T., Ninomiya K., Maksumi S.// J.Biochem. 1982. Vol.92. P.1093-1101.
- Sharma K.K., Orwerth B.J.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.4295-4301.
- Achstetter T., Ehmann C., Wolf D.H.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. Vol.109. P.341-347.
- Lenney J.F.// Biochim. et biophys.acta. 1976. Vol.429. P.214-219.
- Kunze N., Kleinkauf H., Bauer K.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.160. P.605-613.
- Kumon A., Matsuoka Y., Kakimoto Y. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1970. Vol.200. P.466-474.
- Lenney J.F., Baslow M.H., Sugiyama G.H.// Comp.Biochem. and Physiol. 1978. Vol.61B. P.253-259.
- Semenza G.// Biochim. et biophys.acta. 1957. Vol.24. P.401-413.
- Pratt A.G., Crawford E.J., Friedkin M.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.6367-6372.
- Mayer H., Nordwig A.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1973. Vol.354. P.371-379.
- Akrawi A.F., Bailey G.S.// Biochim. et biophys.acta. 1976. Vol.422. P.170-178.
- Adachi H., Kubota I., Okamura N. et al.// J.Biochem. 1989. Vol.105. P.957-961.
- Harper C., Rene A., Campbell B.J.// Biochim. et biophys. acta. 1971. Vol.242. P.446-458.
- Hirota T., Nishikawa Y., Tanaka M. et al.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.160. P.521-525.
- Patterson E.K.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.386-393.
- Patterson E.K.// Ibid. P.377-386.
- Ito Y., Sugitara M., Sawaki S.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P.871-877.
- Brown J.L.// J.Biol.Chem. 1973. Vol.248. P.409-416.
- Lenney J.F., Kan S.-C., Stu K., Sugiyama G.H.// Arch. Biochem. and Biophys. 1977. Vol.184. P.257-266.
- De Lapp N.W., Dieckman D.K.// J.Invest.Dermatol. 1988. Vol.90. P.490-499.
- Gee N.S., Kenny A.J.// Biochem J. 1987. Vol.246. P.97-102.
- Takeuchi K., Shimizu T., Ohoshi N. et al.// J.Biochem. 1989. Vol.106. P.442-445.
- Das M., Hartley J.L., Soffers R.L.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.1316-1319.
- Harrie R.B., Ohlsson J.T., Wilson J.B.// Anal.Biochem. 1981. Vol.111. P.227-234.
- Takeda Y., Hiwada K., Kokubu T.// J.Biochem. 1981. Vol.90. P.1309-1319.
- Lanzillo J.J., Stevens J., Dasarthy Y. et al.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.14938-14944.
- Емисеева Ю.Е., Павлитина Л.В., Орехович В.Н.// ДАН СССР. 1974. Т.217. С.953-957.
- Soffer R.L.// Annu.Rev.Biochem. 1976. Vol.45. P.73-94.
- Nishimura K., Hiwada K., Ueda E., Kokubu T.// Biochim. et biophys. acta. 1976. Vol.445. P.158-160.
- Rohrbach M.S., Williams E.B., Rolstad R.A.// J.Biol.Chem. 1981. Vol.256. P.225-230.
- Kumar R.S., Kusari J., Roy S.N. et al.// Ibid. 1989. Vol.264. P.16754-16758.
- Sharma M., Singh U.S.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.57-61.
- Yaron A.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.599-610.
- Peterson L.M., Sokolovsky M., Vallee B.L.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.2501-2508.
- Bazzone Th.J., Sokolovsky M., Cuert L.B., Vallee B.L.// Ibid. 1979. Vol.18. P.4362-4366.
- Reynolds D.S., Stevens R.L., Gurley D.S.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.20094-20099.
- Bradshaw R.A., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H.// Proc. Nat. Acad.Sci.USA. 1969. Vol.63. P.1389-1394.
- Bodwell J.E., Meyer W.L.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.2767-2777.

- Marinkovic D.V., Marinkovic J.N., Erdos E.G., Robinson C.J.G.// Biochem.J. 1977. Vol.163. P.253-260.
- Folk J.E.// The enzymes. 3rd ed./ Ed. P.D.Boyer. N.Y.; L.: Acad. press, 1971. Vol.3. P.57-79.
- Prahl J.W., Neurath H.// Biochemistry. 1966. Vol.5. P.4137-4145.
- Titani K., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1975. Vol.72. P.1666-1670.
- Трапезникова С.С., Пасхина Т.С.// Биохимия. 1968. Т.33. С.1012-1022.
- Plummer T.H., Hurwitz M.Y.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P.3907-3912.
- Tan F., Weerasinghe D.K., Skidgel R.A. et al.// Ibid. 1990. Vol.265. P.13-19.
- Gebhard W., Schube M., Eulitz M.// Europ.J.Biochem. 1989. Vol.178. P.603-607.
- Skidgel R.A., Davis R.M., Erdos E.G.// Anal.Biochem. 1984. Vol.140. P.520-531.
- Felix F., Brouillet N.// Biochim. et biophys.acta. 1966. Vol.122. P. 127-144.
- Levy C.C., Goldman P.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.3507-3511.
- Levy C.C., Goldman P.// Ibid. 1969. Vol.244. P.4467-4472.
- Young P.E.// Ibid. 1966. Vol.241. P.3462-3467.
- Gartner M., Vacherou M.-J., Gumann M., Michel G.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.148. P.539-543.
- Didberg O., Joris B., Frere J.M. et al.// FEBS Lett. 1980. Vol.117. P.215-218.
- Joris B., von Beeumen J., Casagrande F. et al.// Europ. J. Biochem. 1983. Vol.130. P.53-69.
- Wolf D.H., Weter U.// Ibid. 1977. Vol.73. P.553-556.
- Manser E., Fernandez D., Loo L. et al.// Biochem.J. 1990. Vol.267. P. 517-525.
- Fricker L.D., Evans Ch.J., Esch F.S., Herbert E.// Nature. 1986. Vol. 323. P.461-464.
- Rodriguez C., Brayton K.A., Brownstein M., Dixon J.E.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.5988-5995.
- Davidson H.W., Hutton J.C.// Biochem.J. 1987. Vol.245. P.575-582.
- Hook V.Y.H., Affolter H.-U.// FEBS Lett. 1988. Vol.238. P.338-342.
- Tan F., Chan S.J., Steiner D.F. et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P. 13165-13170.
- Остерман А.Л., Степанов В.М., Руденская Г.Н. и др.// Биохимия. 1984. Т.49. P.292-301.
- Narahashi Y.// J.Biochem. 1990. Vol.107. P.879-886.
- Руденская Г.Н., Крейер В.Г., Ландау Н.С. и др.// Биохимия. 1987. Т. 52. С.2002-2008.
- Hedeager-Sorensen S., Kenny A.J.// Biochem.J. 1985. Vol.229. P.251-257.
- Zwilling R., Jakob P., Bauer H. et al.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol. 94. P.223-229.
- O'Connor B., O'Guinn G.// Ibid. 1985. Vol.150. P.47-52.
- Pfleiderer G., Sumyk G.// Biochim. et biophys.acta. 1961. Vol.51. P. 482-493.
- Ejarnason J.B., Tu A.T.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.3395-3404.
- Shannon J.D., Baramova E.N., Ejarnason J.B., Fox J.W.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.11575-11583.
- Civello D.J., Duong H.L., Geren C.R.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P. 749-755.
- Kurecki T., Laskowski M., Kress L.F.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P. 8340-8345.
- Takeya H., Arakawa M., Miyata T. et al.// J.Biochem. 1989. Vol.106. P.151-157.
- Rothe W., Pfeiderer G., Zwilling R.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol.Chem. 1970. Vol.351. P.629-634.
- Selfer S., Harper E.// The enzymes. 3rd ed./ Ed. P.Boyer. N.Y.; L.: Acad.press, 1971. Vol.3. P.649-697.
- Bond M.D., van Wart H.E.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.3085-3091.
- Wilkes S.H., Prescott J.M.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P. 404-415.
- Ваганова Т.И., Иванова Н.М., Степанов В.М.// Биохимия. 1988. Т.53. С. 1344-1351.
- Лаберит Н.Ю., Панк М.С., Лидберг М.А., Ванатаму К.П.// Там же. 1984. Т.49. P.275-283.
- Yasunobu K.T., McConn J.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.569-575.
- Yang M.Y., Ferrari E., Henner D.J.// J.Bacteriol. 1984. Vol.160. P.

15-21.

- Matsubara H.// *Meth.Enzymol.* 1970. Vol.19. P.642-651.
- Titani K., Hermodson M.A., Ericsson L.H. et al.// *Nature. New Biol.* 1972. Vol.238. P.35-38.
- Takagi M., Imanaka T., Atba S.// *J.Bacteriol.* 1985. Vol.163. P.824-831.
- Dalhammar G., Steiner H.// *Europ.J.Biochem.* 1984. Vol.139. P.247-252.
- Vasantha N., Thompson L.D., Rhodes G. et al.// *J.Bacteriol.* 1984. Vol.159. P.811-819.
- Stoeva S., Kleinschmidt T., Mesrob B., Braunitzer G.// *Biochemistry.* 1990. Vol.29. P.527-534.
- Cheng Y.-S.E., Zipser D.// *J.Biol.Chem.* 1979. Vol.254. P.4698-4706.
- Fitch P.W., Wilson R.E., Brown K. et al.// *Nucl.Acids Res.* 1986. Vol. 14. P.7695-7703.
- Roseman J.E., Levine R.L.// *J.Biol.Chem.* 1987. Vol.262. P.2101-2110.
- Nakajima M., Mizusawa K., Yoshida F.// *Europ.J.Biochem.* 1974. Vol.44. P.87-96.
- Гульник С.В., Лавренова Г.И., Степанов В.М.// *Биохимия.* 1987. Т.52. P.1387-1396.
- Gripson J.C., Hermier J.// *Biochimie.* 1974. Vol. 56. P.1323-1332.
- Morihara K., Tazuke H., Oka T. et al.// *J.Biol.Chem.* 1965. Vol.240. P.3295-3304.
- Fukushima J., Yamamoto S., Morihara K. et al.// *J.Bacteriol.* 1989. Vol.171. P.1698-1704.
- Morihara K.// *Biochim. et biophys.acta.* 1963. Vol.73. P.113-124.
- Miyata K.// *Agr. and Biol.Chem.* 1970. Vol.34. P.1457-1462.
- Lee I.S., Wakabayashi S., Miyata K. et al.// *J.Biochem.* 1984. Vol.96. P.1409-1418.
- Nakahama K., Yoshimura K., Marumoto R. et al.// *Nucl.Acids Res.* 1986. Vol.14. P.5843-5855.
- Arvidson S.// *Biochim. et biophys.acta.* 1973. Vol.302. P.149-157.
- Yan T.-R., Azuma N., Kamimogawa S., Yamauchi K.// *Europ.J.Biochem.* 1987. Vol.163. P.259-265.
- Mäkinen P.-L., Clewell D.B., An F., Mäkinen K.K.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P.3325-3334.
- Chandrasekaran S., Dhar S.C.// *Arch.Biochem. and Biophys.* 1987. Vol. 257. P.402-408.
- Cowan D.A., Dantel R.M.// *Biochim. et biophys.acta.* 1982. Vol.705. P. 293-305.
- Day W.C., Tonolo P., Stratman S.L. et al.// *Ibid.* 1968. Vol.167. P. 597-606.
- Blow A.M.J., van Heyningen R., Barrett A.J.// *Biochem.J.* 1975. Vol. 145. P.591-599.
- Prescott J.M., Wagner F.W.// *Meth.Enzymol.* 1976. Vol. 45, Pt.B. P. 397-404.
- Woolley D.C., Tucker J.S., Green G., Evanson J.M.// *Biochem.J.* 1976. Vol.153. P.119-126.
- Harrie E.D., Cartwright E.// *Proteinases of mammalian cells and tissues/* Ed. A.J.Barrett. Amsterdam: North Holland, 1977. P.249-283.
- Goldberg G.I., Wilhelm S.M., Kronberger A. et al.// *J.Biol. Chem.* 1986. Vol.261. P.6600-6605.
- Jeffrey J.J., Gross J.// *Biochemistry.* 1970. Vol.9. P.268-273.
- Itjima K.-t., Kleht J.-t., Hayakawa T.// *J.Biochem.* 1981. Vol.89. P. 1101-1106.
- Leclercy A., Kell-Dlouha V., Woods D.R. et al.// *FEBS Lett.* 1975. Vol.59. P.167-172.
- Kell-Dlouha V.// *Biochim. et biophys.acta.* 1976. Vol.429. P.239-251.
- Trocherts I., Herry P., Kell-Dlouha V., Kell B.// *Ibid.* 1980. Vol. 615. P.436-448.
- Rippon J.W.// *J.Bacteriol.* 1968. Vol.95. P.43-46.
- Landsperger W.J., Peters E.H., Dresden M.H.// *Biochim. et biophys.acta.* 1981. Vol.661. P.213-220.
- Seltzer J.L., Adams S.A., Grant G.A., Eisen A.Z.// *J.Biol.Chem.* 1981. Vol.256. P.4662-4668.
- Mikuni-Takagaki Y., Gross J.// *Ibid.* 1984. Vol.259. P. 6739-6747.
- Nethery A., OGrady R.L.// *Biochim. et biophys.acta.* 1989. Vol.994. P. 149-160.
- Galloway W.A., Murphy G., Sandy J.D. et al.// *Biochem.J.* 1983. Vol. 209. P.741-752.
- Chin J.R., Murphy G., Werb Z.// *J.Biol.Chem.* 1985. Vol.260. P.12367-12376.

- Whittham S.E., Murphy G., Angel P. et al.// Biochem.J. 1986. Vol.240. P.913-916.
- Okada Y., Nadase H., Harris E.D.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P. 14245-14255.
- Saus J., Quinones S., Otani Y. et al.// Ibid. 1988. Vol.263. P.6742-6745.
- Wilhelm S.M., Collier I.E., Kronberger A. et al.// Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 1987. Vol.84. P.6725-6729.
- Murphy G., McAlpine Ch.G., Poll Ch.T., Reynolds J.J.// Biochim. et biophys.acta. 1985. Vol.831. P.49-58.
- Yu R.J., Harmon S.R., Blank P.// J.Bacteriol. 1968. Vol.96. P.1435-1436.
- Mumford R., Pterzechala P.A., Strauss A.W., Zimmerman M.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1981. Vol.78. P.6623-6627.
- Fulcher I.S., Chaplin M.F., Kenney A.J.// Biochem.J. 1983. Vol.215. P.317-323.
- Fulcher I.S., Kenney A.J.// Ibid. Vol.211. P.743-753.
- Gee N.S., Matsas R., Kenney A.J.// Ibid. Vol.214. P.377-386.
- Malfroy B., Schwartz J.-C.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.14365-14370.
- Devault A., Lazure C., Nault Ch. et al.// EMBO J. 1987. Vol.6. P. 1317-1322.
- Malfroy B., Schofield P.R., Kuang W.-J. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1987. Vol.144. P.59-66.
- Malfroy B., Kuang W.-J., Seeburg P.H. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol. 229. P.206-210.
- Beynon R.J., Shannon J.D., Bond J.S.// Biochem.J. 1981. Vol.199. P. 591-598.
- Butler P.E., McKay M.J., Bond J.S.// Ibid. 1987. Vol.241. P.229-235.
- Orlowski M., Wilk S.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.4942-4950.
- Relton J.M., Gee N.S., Matsas R. et al.// Biochem.J. 1983. Vol.215. P.519-523.
- Lee C.-M., Sandberg B.E.B., Hanley M.R., Iversen L.L. // Europ. J. Biochem. 1981. Vol.114. P.315-327.
- Endo S., Yokasawa H., Ishii S.-t.// J.Biochem. 1988. Vol.104. P.999-1006.
- Mura S., Amaya Y., Mori M.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1986. Vol.134. P.1151-1159.
- Kumamoto T., Ito A., Omura T.// J.Biochem. 1986. Vol.100. P.247-254.
- Sterchi E.E., Naim H.Y., Lentze M.J. et al.// Arch.Biochem. and Biophys. 1988. Vol.265. P.105-118.
- Kirschner R.Y., Goldberg A.L.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.967-976.
- Barrett D., Edwards B.F.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.354-373.
- Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K.// J.Biochem. 1989. Vol.105. P.204-211.
- Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K.// Ibid. P.212-218.
- Hotez P.J., le Traug N., McKerrow J.H., Cerami A.// J. Biol. Chem. 1985. Vol.260. P.7343-7348.
- Stöcker W., Wolz R.L., Zwilling R. et al.// Biochemistry. 1988. Vol. 27. P.5026-5032.
- Tilant K., Torff H.-J., Hormel S. et al.// Ibid. 1987. Vol.26. P.222-226.
- Taniguchi Y., Akasaka K., Shiroya T., Shimada H.// J.Biochem. 1986. Vol.99. P.931-938.
- Kornfeld S.J., Plant A.G.// Rev.Infect.Diseases. 1981. Vol.3. P.521-533.
- Halila R., Peltonen L.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.1251-1256.
- Hojima Y., McKenzie J., Rest M.v.d., Prockop D.J.// J. Biol. Chem. 1989. Vol.264. P.11336-11345.
- Njeha F.K., Morikawa T., Tuderman L., Prockop D.J.// Biochemistry. 1982. Vol.21. P.757-764.
- Ishida M., Ogawa M., Kosaki G. et al.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P. 17-24.
- Katayama K., Kuwada M.// Biochim. et biophys.acta. 1984. Vol.787. P. 138-145.
- Hiroi Y., Natori Y.// J.Biochem. 1987. Vol.102. P.985-992.
- Gluschkof P., Morel A., Benoit R., Cohen P.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1985. Vol.128. P.1051-1057.
- Gluschkof P., Gomez S., Morel A., Cohen P.// J.Biol.Chem. 1987.

- Vol.262. P.9615-9620.
- Brakch N., Bousse Ha.M., Rhoiam M., Cohen P.// Ibid. 1989. Vol.264. P.15912-15916.
- Checler F., Vincent J.-P., Kitabgi P.// Ibid. 1986. Vol.261. P.11274-11281.
- Kenny A.J., Ingram J.// Biochem.J. 1987. Vol.245. P.515-524.
- Vodkin L.O., Scandalios J.G.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.4660-4667.
- Robinson C., Ellis R.J.// Europ.J.Biochem. 1984. Vol.142. P.337-342.
- Воскобойникова Н.Е., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А. и др.// Биохимия. 1989. Т.54. С.1965-1973.
- Kohn H., Yamashina I.// Biochim. et biophys.acta. 1972. Vol.258. P.600-617.
- Schar H.P., Holzmann W., Ramos Tombo G.M., Ghisalba O.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.158. P.469-475.
- Miyake M., Inami T., Kakimoto Y.// Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol.760. P.206-214.
- Kikuchi M., Koshiyama I., Fukushima D.// Ibid. Vol.744. P.180-188.
- Kuwabara S.// Biochem.J. 1970. Vol.118. P.457-465.
- Davies R.B., Abraham E.P.// Ibid. 1974. Vol.143. P.115-127.
- Baldwin G.S., Edwards G., Ktiner P.A. et al.// Ibid. 1980. Vol.191. P.111-116.
- Швабас В., Галаев И.Ю., Козлова Е.В.// Биохимия. 1984. Т.49. С.1486-1491.
- Dayhoff M.O. Atlas of protein sequence and structure. Wash. (D.C.): Nat.Biomed.Res.Found. 1972. Vol.5.
- Krell G.// Annu.Rev.Biochem. 1981. Vol.50. P.317-348.
- Craik C.S., Sprang S., Fletterick R., Rutter W.J.// Nature. 1982. Vol.299. P.180-182.
- Rogers J.// Ibid. 1985. Vol.315. P.458-459.
- Neurath H., Walsh K.A., Winter W.P.// Science. 1967. Vol.158. P.1638-1640.
- Cornigh-Bowden A.// Biochem.J. 1980. Vol.191. P.349-354.
- De Haen C., Neurath H., Teller D.C.// J.Mol.Biol. 1975. Vol.92. P.225-259.
- IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.3557-3559.
- Sharma S.K., Hopkins Th.R.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.1008-1013.
- Maroux S., Desnuelle P.// Biochim. et biophys.acta. 1969. Vol.181. P.59-72.
- Березин И.В., Казанская Н.Ф., Ларионова Н.И.// Биохимия. 1970. Т.35. С.983-988.
- Bender M.L., Begue-Canton M.L., Blakeley R.L. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1966. Vol.88. P.5890-5913.
- Metrione R.M.// TIBS. 1986. Vol.11. P.117-118.
- Brenner S.// Nature. 1988. Vol.334. P.528-530.
- Foltman B., Pedersen V.B.// Adv.Exp. and Med.Biol. 1977. Vol.95. P.3-22.
- Tang J.// Mol. and Cell.Biochem. 1979. Vol.26. P.93-109.
- Bargetzi J.P., Thompson E.O.P., Sampath Kumar K.S.V. et al.// J.Biol.Chem. 1964. Vol.239. P.3767-3774.
- Wintersberger E., Cox D.J., Neurath H.// Biochemistry. 1965. Vol.4. P.1526-1532.
- Hooper N.M., Turner A.J.// FEBS Lett. 1988. Vol.229. P.340-344.
- Clement G.E., Rooney J., Zakheim D., Eastman J.// J.Amer.Chem.Soc. 1970. Vol.92. P.186-189.
- Williams S.P., Bridger W.A., James M.N.G.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.6655-6659.
- Vermeer C.// Biochem.J. 1990. Vol.266. P.625-636.
- Бланделл Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М: Мир. 1979.
- Matthews B.W., Stigler P.B., Henderson R., Blow D.M.// Nature. 1967. Vol.214. P.652-656.
- Birktoft J.J., Blow D.M.// J.Mol.Biol. 1972. Vol.68. P.187-240.
- Blow D.M.// Isr.J.Chem. 1974. Vol.12. P.483-494.
- Raghavan N.V., Tullinsky A.// Acta crystallogr. 1979. Vol.35B. P.1776-1785.
- Blevins R.A., Tullinsky A.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.4264-4275.
- Blevins R.A., Tullinsky A.// Ibid. P.8865-8872.
- Teukada H., Blow D.M.// J.Mol.Biol. 1985. Vol.184. P.703-711.
- Cohen G.H., Silverton E.W., Davies D.R.// Ibid. 1981. Vol.148. P.449-479.

- Dixon M.M., Mathews B.W.// *Biochemistry*. 1989. Vol.28. P.7033-7038.
- Birktoft J.J., Kraut J., Freer S.T.// *Ibid.* 1976. Vol.15. P.4481-4485.
- Wang D., Bode W., Huber R.// *J.Mol.Biol.* 1985. Vol.185. P.595-624.
- Stroud R.M., Kay L.M., Dickerson R.E.// *Ibid.* 1974. Vol.83. P.185-208.
- Fehlhammer H., Bode W.// *Ibid.* 1975. Vol.98. P.683-692.
- Bode W., Schwager P.// *Ibid.* P.693-717.
- Chambers J.L., Stroud R.M.// *Acta crystallogr.* 1977. Vol.33B. P.1824-1837.
- Huber R., Bode W.// *Accounts Chem.Res.* 1978. Vol.11. P.114-122.
- Chambers J.L., Stroud R.M.// *Acta crystallogr.* 1979. Vol.35B. P.1861-1875.
- Kosztakoff A.A., Chambers J.L., Kay L.M., Stroud R.M.// *Biochemistry*. 1977. Vol.16. P.654-664.
- Fehlhammer H., Bode W., Huber R.// *J.Mol.Biol.* 1977. Vol.111. P.415-438.
- Bode W.// *Ibid.* 1979. Vol.127. P.357-374.
- Sawyer L., Shottou D.M., Wendell C.P.L. et al.// *Ibid.* 1978. Vol.118. P.137-208.
- Meyer E.F., Cole G., Radhakrishnan R., Epp O.// *Acta crystallogr.* 1988. Vol.44B. P.26-38.
- Bode W., Meyer E., Powers J.C.// *Biochemistry*. 1989. Vol.28. P.1951-1963.
- Bode W., Chen Z., Bartels K. et al.// *J.Mol.Biol.* 1983. Vol.164. P.237-282.
- Fujinaga M., James M.N.G.// *Ibid.* 1987. Vol.195. P.373-396.
- Remington S.J., Woodbury R.G., Reynolds R.A.// *Biochemistry*. 1988. Vol.27. P.8097-8105.
- Tulinsky A., Park C.H., Skrzypczak-Jankun E.// *J.Mol.Biol.* 1988. Vol.202. P.885-901.
- Read R.J., James M.N.G.// *Ibid.* Vol.200. P.523-551.
- Bott R., Uitech M., Kosztakoff A. et al.// *J.Biol.Chem.* 1988. Vol.263. P.7895-7906.
- Mathews D.A., Alden R.A., Birktoft J.J. et al.// *Ibid.* 1977. Vol.252. P.8875-8883.
- Drenth J., Hol W.G.J., Jansz J.N., Koekoek R.// *Europ.J.Biochem.* 1972. Vol.26. P.177-181.
- Tepljakov A.V., Kuranova I.P., Harutyunyan E.H. et al.// *FEBS Lett.* 1989. Vol.244. P.208-212.
- Brayer G.D., Delbaere L.T.J., James M.N.G.// *J.Mol.Biol.* 1978. Vol.124. P.261-283.
- Stelecki A.R., Hendrickson W.A., Broughton C.G. et al.// *Ibid.* 1979. Vol.134. P.781-804.
- Moult J., Sussman F., James M.N.G.// *Ibid.* 1985. Vol.182. P.555-566.
- James M.N.G., Delbaere L.T.J., Brayer G.D.// *Canad.J.Biochem.* 1978. Vol.56. P.396-402.
- Greenblatt H.H., Ryan C.A., James M.N.G.// *J.Mol.Biol.* 1989. Vol.205. P.201-228.
- Brayer G.D., Delbaere L.T.J., James M.N.G.// *Ibid.* 1979. Vol.131. P.743-775.
- Fujinaga M., Delbaere L.T.J., Brayer G.D., James M.N.G.// *Ibid.* 1985. Vol.184. P.479-502.
- Betzel Ch., Pal G.P., Saenger W.// *Acta crystallogr.* 1988. Vol.44B. P.163-172.
- Kelly J.A., Knox J.R., Moews P.C. et al.// *J.Biol.Chem.* 1985. Vol.260. P.6449-6458.
- Moews P.C., Knox J.R., Didsberg O. et al.// *Proteins*. 1990. Vol.7. P.156-171.
- Kamphuis I.G., Kalk K.H., Swarte M.B.A., Drenth J.// *J. Mol. Biol.* 1984. Vol.179. P.233-256.
- Kamphuis I.G., Drenth J., Baker E.N.// *Ibid.* 1985. Vol.182. P.317-329.
- Baker E.N.// *Ibid.* 1977. Vol.115. P.263-277.
- Baker E.N.// *Ibid.* 1980. Vol.141. P.441-484.
- Heinemann U., Pal G.P., Hilgenfeld R., Saenger W.// *Ibid.* 1982. Vol.161. P.591-606.
- Andreeva N.S., Gustchina A.E., Fedorov A.A. et al.// *Adv.Exp.Med. and Biol.* 1977. Vol.95. P.23-31.
- Андреева Н.С., Федоров А.А., Гущина А.Е. и др.// *Молекуляр. биол.* 1978. Т.12. С.922-935.
- Андреева Н.С., Жданов А.С., Федоров А.А. и др.// *Там же.* 1984. Т.18.

C.313-322.

Stelecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A. et al.// J.Mol.Biol. 1990. Vol.214. P.148-170.

James M.N.G., Stelecki A.R.// Nature. 1986. Vol.319. P.33-38.

Harteuck J.A., Remington S.J.// Abstr. 18th Linderstrom-Lang conf. on aspartic proteinases (4-8 July 1988, Elsinore) 1988. P.28.

Сайфр М.Г., Андреева Н.С., Жданов А.С.// Молекуляр.биол. 1985. Т.19. С.400-411.

Gilliland G.L., Winborne E.L., Nachman J., Wlodawer A.// Abstr. 18th Linderstrom-Lang Conf. on aspartic proteinases (4-8 July 1988, Elsinore) 1988. P.29.

Stelecki A.R., Hayakawa K., Fujinaga M. et al.// Science. 1989. Vol.243. P.1346-1351.

Hsu I.N., Delbaere L.T.J., James M.N.G., Hofmann Th.// Nature. 1977. Vol.266. P.140-145.

James M.N.G., Stelecki A.R.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.163. P.299-361.

Subramanian E., Swan I.D.A., Liu M. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1977. Vol.74. P.556-559.

Wong Chi-H., Lee T.J., Lu T.-H., Yang I.-Ho.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.1638-1640.

Blundell T., Jenkins J.A., Sewell B.T.// J.Mol.Biol. 1990. Vol.211. P.919-941.

Subramanian E., Liu M., Swan I.D.A., Davies D.R.// Adv.Exp.Biol. and Med. 1977. Vol.95. P.33-41.

Suguna K., Bott R.R., Padlan E.A. et al.// J.Mol.Biol. 1987. Vol.196. P.877-900.

Fraser M.E., Hayakawa K., Yoshinaka Y. et al.// Viral proteinases as targets for chemotherapy. N.Y.: Cold Spring Harbor.Lab., 1989.

Miller M., Jaskolski M., Mohana Rao J.K. et al.// Nature. 1989. Vol.337. P.576-579.

Navia M.A., Fitzgerald P.M.D., McKeever B.M. et al.// Ibid. P.615-620.

Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M et al.// Science. 1989. Vol.245. P.616-621.

Rees D.C., Lewis M., Lipscomb W.N.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.168. P.367-387.

Rees D.C., Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol.80, P.7151-7154.

Hardman K.D., Lipscomb W.N.// J.Amer.Chem.Soc. 1984. Vol.106. P.463-464.

Schmidt M.F., Herrtrott J.R.// J.Mol.Biol. 1976. Vol.103. P.175-190.

Matthews B.W., Jancionius J.N., Colman P.M. et al.// Nature. New Biol. 1972. Vol.238. P.37-41.

Kester W.R., Matthews B.W.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.7704-7710.

Holmes M.A., Matthews B.W.// J.Mol.Biol. 1982. Vol.160. P.623-639.

Fauptit R.A., Karlsson R., Ploot D. et al. // Ibid. 1988. Vol.199. P.525-537.

Поляков К.М., Обмолова Г.В., Куранова И.П. и др.// Молекуляр.биол. 1989. Т.3. С.266-272.

Dideberg O., Charlier P., Dive G. et al.// Nature. 1982. Vol.299. P.469-470.

Delbaere L.T.J., Hutcheon W.L.B., James M.N.G., Thiesen W.E.// Ibid. 1975. Vol.257. P.758-763.

Kopp P., Steiner R., Dahlmann B. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol.872. P.253-260.

Baumetster W., Dahlmann B., Hegerl R. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol.241. P.239-245.

Andreeva N.S., Gustchina A.E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. Vol.87. P.32-42.

Blundell T.L., Sewell B.T., McLachlan A.D.// Biochim. et biophys. acta. 1979. Vol.580. P.24-31.

Tang J., James M.N.G., Hsu I.N. et al.// Nature. 1978. Vol.271. P.618-621.

Андреева Н.С.// Молекуляр.биол. 1985. Т.19. С.218-224.

Meek T.D., Dayton B.D., Metcalf B.W. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1989. Vol.86. P.1841-1845.

Kiselev N.A., Stel'mashchuk V.Ya., Teuprun V.L. et al.// J.Mol.Biol. 1977. Vol.115. P.33-43.

Taylor A., Voiz K.W., Lipscomb W.N., Takemoto L.J.// J.Biol. Chem. 1984. Vol.259. P.14757-14761.

Leatherbarrow R.J., Fersht A.R.// Enzyme mechanism/ Ed. M.I.Page, A.

- Willams L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.78-96.
- Jansen E.F., Nutting M.-D.F., Jang R., Ballis A.K.// J.Biol.Chem.1949. Vol.179. P.189-199.
- Schaffer N.K., Harshman S., Engle R.R.// Ibid. 1955. Vol.214. P.799-806.
- Oosterbaan R.A., Kunst P., Rotterdam J., Cohen J.A.// Biochim. et biophys.acta. 1958. Vol.27, P.556-563.
- Naughton M.A., Sanger F., Hartley B.S., Shaw D.C.// Biochem.J. 1960. Vol.77. P.149-163.
- Kramer K.J., Felsted R.L., Law J.H.// J.Biol.Chem. 1973. Vol.248. P. 3021-3028.
- Gross J., Harper H., Harris E.D. et al.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1974. Vol.61. P.605-612.
- Lecroisey A., Kell B.// Ibid. 1983. Vol.112. P.907-910.
- Kaneda M., Ohmine H., Yonezawa H., Tomimaga N.// J.Biochem.1984. Vol. 95. P.825-829.
- Tomkinson B., Wernstedt C., Hellman U., Zetterquist Ö.// Proc.Nat. Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.7508-7512.
- Isackson P.J., Ullrich A., Bradshaw R.A.// Biochemistry. 1984. Vol. 23. P.5997-6002.
- Duez C., Joris B., Frère J.-M. et al.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P. 83-86.
- Kroth-Hunziker V., Petursson S., Jayatilake G.S. et al.// Biochem.J. 1982. Vol.201. P.621-627.
- Yocum R.R., Waxman D.J., Rasmussen J.R., Strominger J.L.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1979. Vol.76. P.2730-2734.
- Heckler T.G., Day R.A.// Biochim. et biophys.acta. 1983. Vol.745. P. 292-300.
- Balls A.K., Aldrich F.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1955. Vol.41. P. 190-194.
- Schoellmann G., Shaw E.// Biochemistry. 1963. Vol.2. P.253-258.
- Nakagawa Y., Bender M.L.// Ibid. 1970. Vol.9. P.259-263.
- Henderson R.// Biochem.J. 1971. Vol.124. P.13-18.
- Антонов В.К., Воротишцева Т.И.// ДАН СССР. 1972. Т.202. С.1441-1442.
- Blow D.M., Birkeoft J.J., Hartley B.S.// Nature. 1969. Vol.221. P. 337-340.
- Henderson R.// J.Mol.Biol. 1970. Vol.54. P.341-354.
- Stettin T.A., Henderson R., Blow D.M. // Ibid. 1969. Vol.46. P.337-348.
- Robertus J.D., Kraut J., Alden R.A., Birkeoft J.J.// Biochemistry. 1972. Vol.11. P.4293-4303.
- Kimmel J.R., Smith E.L.// J.Biol.Chem. 1954. Vol.207. P.515-531.
- Balls A.K.// Nature. 1939. Vol.144. P.513-515.
- Lowe G., Williams A.// Biochem.J. 1965. Vol.96. P.194-204.
- Gilles A.-M., DeWolf A., Kell B.// Europ.J.Biochem. 1983. Vol.130. P. 473-479.
- Suzuki K., Hayashi H., Hayashi T., Iwai K.// FEBS Lett.1983. Vol.152. P.67-70.
- Gilles A.-M., Kell B.// Ibid. 1984. Vol.173. P.58-62.
- Clark P.I., Lowe G.// Europ.J.Biochem. 1978. Vol.84. P.293-299.
- Nakayama S.-i., Hoshino M., Takahashi K. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Commun. 1981. Vol.98. P.471-475.
- Nakayama S.-i., Watanabe T., Takahashi K. et al.// J.Biochem. 1987. Vol.102. P.531-535.
- Delpierre G.R., Fruton J.S.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1965. Vol.54. P. 1161-1167.
- Delpierre G.R., Fruton J.S.// Ibid. 1966. Vol.56. P.1817-1822.
- Козлов Л.В., Гуноджан Л.М., Орехович В.Н.// Биохимия. 1967. Т.32. С. 1011-1019.
- Lundblad R.L., Stein W.H.// J.Biol.Chem. 1969. Vol.244. P.154-160.
- Hartsuck J.A., Tang J.// Ibid. 1972. Vol.247. P.2575-2580.
- James M.N.G., Hsu I.-N., Delbaere L.T.J.// Nature. 1977. Vol.267. P. 808-813.
- Tsuru D., Shimada S., Maruta S. et al.// J.Biochem.1986. Vol.99. P. 1537-1539.
- Pechik I.V., Gustahina A.E., Andreeva N.S., Fedorov A.A.// FEBS Lett. 1989. Vol.247. P.118-122.
- Argos P., Garavito R.M., Eventoff W. et al.// J.Mol.Biol. 1978. Vol. 126. P.141-158.
- Vallee B.L., Auld D.S.// Biochemistry. 1990. Vol.29. P.5648-5659.
- Soubrier F., Athens-Gelas F., Hubert C. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.

- USA. 1988. Vol.85. P.9386-9390.
- Harrie R.B., Wilson I.B.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.2208-2211.
- Wilkes S.H., Bayliss M.E., Prescott J.M.// Ibid. 1988. Vol.263. P. 1821-1825.
- Devault A., Nault Ch., Zollinger M. et al.// Ibid. P.4033-4040.
- Frohne M., Kettmann V.// Acta biol. et med.germ. 1976. Vol.35. P.353-357.
- Cuyper H.Th., Loon-Klaassen L.A.H.v., Vree Egberts W.T.M. et al.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.7086-7091.
- Imamura T., Kawata S., Ninomiya K., Maksumi S.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P.267-273.
- Garavito R.M., Rosemann M.G., Argos P., Eventoff W.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.5065-5071.
- Андреева Н.С. Частное сообщение.
- Kramer G., Argos P.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.669. P.93-97.
- Ропин Д.А.// Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир. 1973. С. 255-319.
- Rosst G.L., Bernhardt S.A.// J.Mol.Biol. 1970. Vol.49. P.85-91.
- Corey R.B., Battfay O., Bruckner D.A., Mark F.G.// Biochim. et biophys.acta. 1965. Vol.94. P.535-545.
- Matthews B.W., Cohen G.N., Silverton E.W. et al.// J.Mol.Biol. 1968. Vol.36. P.179-195.
- Segal D.M., Cohen G.H., Davies D.R. et al.// Cold.Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 1972. Vol.36. P.85-90.
- Huang T.-H., Bachovchin W.W., Griffin R.G., Dobson Ch.M.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.5933-5937.
- Spilburg C.A., Bethune J.L., Vallee B.L.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. Vol.71, P.3922-3926.
- Spilburg C.A., Bethune J.L., Vallee B.L.// Biochemistry. 1977. Vol. 16. P.1142-1150.
- Johansen J.T., Vallee B.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1973. Vol.70. P. 2006-2010.
- Rtordan J.F., Muszynska G.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1974. Vol.57. P.447-451.
- Johansen J.T., Klyosov A.A., Vallee B.L.// Biochemistry. 1976. Vol. 15. P.296-303.
- Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA.1973. Vol.70. P.3797-3801.
- Alter G.M., Leussing D.L., Neurath H., Vallee B.L.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.3663-3668.
- Anderson W.F., Fletterick R.J., Stettz T.A.// J.Mol.Biol. 1974. Vol: 86. P.261-269.
- Hajdu J., Acharya K.R., Stuart D.I. et al.// TIBS. 1988. Vol.13. P. 104-109.
- Ламри Р., Билтонен Р.// Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. С. 7-173.
- Литвиненко Г.И., Авилова Т.В.// Успехи совр.биол. 1973. Т.75. С.26-45.
- Gurd F.R.N., Rothgeb T.M.// Adv.Protein Chem. 1979. Vol.33. P.73-165.
- Кайваряйнен А.И.// Динамическое поведение белков в водной среде и их функции. Л.: Наука, 1980.
- Аостуров Л.В.// Молекуляр.биол. 1983. Т.17. С.683-704.
- Аостуров Л.В., Варшавский Я.М.// Там же. 1978. Т.12. С.36-46.
- Harrison L.W., Auld D.S., Vallee B.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1975. Vol.72. P.4356-4360.
- Ribeiro A.A., King R., Restivo Ch., Jardetzky O.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.4040-4051.
- Artymtuk P.J., Blake C.C.F., Grace D.E.P. et al.// Nature. 1979. Vol.280. P.563-568.
- McCammon J.A., Wolynes P.G., Karplus M.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.927-942.
- Scheele R.K., Wart H.E.v., Vallee B.L., Scheraga H.A.// Ibid. 1980. Vol.19. P.759-766.
- Попов Е.М.// Молекуляр.биол. 1975. Т.9. С.578-593.
- Karplus M.// CRC Crit.Rev.Biochem. 1981. Vol.9. P.283-320.
- Gunsteren W.F.v., Karplus M.// Biochemistry. 1982. Vol.21. P.2259-2274.
- Piszkiewicz D., Bruce T.C.// Ibid. 1968. Vol.7. P.3037-3047.
- Oliver C.N., Stadtman E.R.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol.80. P. 2156-2160.
- Chatonnet A., Masson P.// FEBS Lett. 1985. Vol.182. P.493-498.

- Boopathy R., Balasubramanian A.S.// *Europ.J.Biochem.* 1987. Vol.162. P.191-197.
- Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A.// *Science.* 1987. Vol.234. P. 1566-1570.
- Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G.// *Ibid.* P.1570-1573.
- Jacobs J., Schultz P.G., Sugawara R., Powell M.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1987. Vol.109. P.2174-2176.
- Janda K.D., Lerner R.A., Tramontano A.// *Ibid.* 1988. Vol.110. P.4835-4837.
- Benkovic S.J., Napper A.D., Lerner R.A.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1988. Vol.85. P.5355-5358.
- Tramontano A., Ammann A.A., Lerner R.A.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1988. Vol. 110. P.2282-2286.
- Pollack S.J., Schultz P.G.// *Ibid.* 1989. Vol.111. P.1929-1931.
- Lerner R.A., Tramontano A.// *TIBS.* 1987. Vol.12. P.427-430.
- Брос Т., Бенкович С.// *Механизмы биорганических реакций.* М.: Мир, 1970.
- Bender M.L.// *Mechanisms of homogeneous catalysis from proton to proteins.* N.Y.: Wiley-Intersci., 1971.
- O'Connor C.// *Quart.Rev.* 1970. Vol.24. P.553-564.
- Дженкс В.// *Катализ в химии и энзимологии.* М.: Мир, 1972.
- Hegazi M.F., Quinn D.M., Schowen R.L.// *Transition state of biochemical processes*// Ed. R.D.Gandour, R.L.Schowen. N.Y.: Plenum Press, 1978. P.355-428.
- Dugas H., Penney C.// *Bioorganic chemistry: A chemical approach to enzyme action.* N.Y.: Springer, 1981.
- Fersht A.R., Requena Y.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1971. Vol.93. P.3499-3504.
- Morawetz H., Otake P.S.// *Ibid.* 1963. Vol.85. P.463-468.
- Jencks W.P., Schaffhausen B., Tornheim K., White H.// *Ibid.* 1971. Vol.93. P.3917-3922.
- Дьяченко Е.Д., Козлов Л.В., Антонов В.К.// *Биоорг.химия.* 1977. Т.3. С.99-104.
- Дьяченко Е.Д., Козлов Л.В., Антонов В.К.// *Биохимия.* 1971. Т.36. С. 981-984.
- Fastrez J., Fersht A.R.// *Biochemistry.* 1973. Vol.12. P.2025-2034.
- Козлов Л.В., Гиноджан Л.М., Орехович В.Н., Валуева Т.А.// *Биохимия.* 1966. Т.31. С.315-321.
- Carpenter F.H.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1960. Vol.82. P.1111-1122.
- Козлов Л.В., Гиноджан Л.М.// *Биохимия.* 1965. Т.30. С.1051-1054.
- Jencks W.P., Cordes S., Carriuolo J.// *J.Biol.Chem.* 1960. Vol. 235. P. 3608-3614.
- Fastrez J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1977. Vol. 99, N 21. P. 7004-7013.
- Sander E.G., Jencks W.P.// *Ibid.* 1968. Vol.90. P.6154-6162.
- Dobry A., Fruton J.S., Sturtevant J.M.// *J.Biol.Chem.* 1952. Vol.195. P.149-154.
- Sturtevant J.M.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1955. Vol.77. P.1495-1498.
- Forrest W.W., Gutfreund H., Sturtevant J.M.// *Ibid.* 1956. Vol.78. P. 1349-1352.
- Rawitscher M., Wadsö I., Sturtevant J.M.// *Ibid.* 1961. Vol.83. P. 3180-3184.
- Белл Р.// *Протон в химии.* М.: Мир, 1977. С.96.
- Martinek K., Semenov A.N., Berezn I.V.// *Biochim. et biophys. acta.* 1981. Vol.658. P.76-89.
- Kahne D., Still W.C.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1988. Vol.110. P.7529-7534.
- Yamana T., Mizukami Y., Tsuji A. et al.// *Chem. and Pharm.Bull.* 1972. Vol.20. P.881-891.
- Sluyterman L.A.E.// *Biochim. et biophys.acta.* 1968. Vol.151. P.178-187.
- Bender M.L., Turnquest B.W.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1955. Vol.77. P.4271-4275.
- Hine J., King R.S.-M., Midden W.R., Sinha A.// *J.Org.Chem.* 1981. Vol. 46. P.3186-3189.
- Jaffe H.H.// *Chem.Rev.* 1953. Vol.53. P.191-212.
- Толст Р.У.// *Пространственные эффекты в органической химии.* Под ред. М.С.Ньюмена. М.: Изд-во иностр.лит., 1960.
- Пальм Б.А.// *Основы количественной теории органических реакций.* Л.: Химия, 1967.
- Shorter J.// *Quat.Rev.* 1970. Vol.24. P.433-453.
- Ritchie C.D., Sager W.F.// *Progr.Phys.Org.Chem.* 1964. Vol.2. P.323-355.

- De Los F., De Tar.// J.Org.Chem. 1980. Vol.45. P.5166-5174.
Дмитриева М.Р., Хурези Ю.И.// Изв. АН СССР. Сер. хим. 1965. Т.7. С. 1174-1180.
Idoux J.P., Scandrett J.M., Sikorski J.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.4577-4583.
Charton M., Charton B.I.// J.Org.Chem. 1979. Vol.44. P.2284-2287.
Коннект И.А.// Реакц.способн.органич.соед.(Тапту). 1965. Т.2. С.26-32.
Hancock C.K., Meyers E.A., Yager B.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1961. Vol. 83. P.4211-4214.
Neuman M.S.// Ibid. 1950. Vol.72. P.4783-4786.
Robinson J.R., Matheson L.E.// J.Org.Chem. 1969. Vol.34. P.3630-3633.
Antonov V.K., Rumsh L.D.// FEBS Lett. 1970. Vol.9. P.67-71.
Menger F.M., Smith J.N.// Tetrahedron Lett. 1970. P.4163-4168.
Stauffer C.E.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.7887-7891.
Holley A.D., Holley R.W.// Ibid. 1950. Vol.72. P.2771-2772.
Frère J.M., Kelly J.A., Klein D. et al.// Biochem.J. 1982. Vol.203. P.223-234.
Rao S.N., O'Ferrall R.A.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1990. Vol.112. P.2729-2735.
Pracejus H.// Chem.Ber. 1959. Vol.92. P.988-998.
Scamayaj V., Brown R.S.// J.Org.Chem. 1986. Vol.51. P.2676-2686.
Scamayaj V., Shorey K.I., Brown R.S., Ball R.G.// Ibid. P.4886-4872.
Shorey K.I., Scamayaj V., Brown R.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1989. Vol. 111. P.1445-1452.
Karve D.D., Kelkar B.W.// Proc.Indian Acad.Sci. 1946. Vol.24A. P. 254-258.
Price F.P., Hammett L.P.// J.Amer.Chem.Soc. 1941. Vol.63. P.2387-2393.
Ikeda K., Kurugi S.// J.Biochem. 1980. Vol.88. P.977-986.
Knudson S.K., Idoux J.P.// J.Org.Chem. 1979. Vol.44. P.520-523.
Weiner S.J., Singh U.Ch., Kollman P.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol. 107. P.2219-2229.
Fukuda E.K., McIver R.T.// Ibid. 1979. Vol.101. P.2498-2499.
Kim J.K., Caserio M.C.// Ibid. 1981. Vol.103. P.2124-2127.
Scatchard G.// Chem.Rev. 1932. Vol.10. P.229-245.
АМУС Э.// Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций. М.: Мир, 1968.
Tommlia E., Murto M.L.// Acta chem.scand. 1963. Vol.17. P.1947-1956.
Richards J.H.// The Enzymes. / Ed. P.D.Boyer. N.Y.: Acad.Press. 1970. Vol.2. P.321-333.
Melander L., Saunders W.H.// Reaction rates of isotopic molecules. N.Y.: Wiley, 1980.
Bruce T.C.// Annu.Rev.Biochem. 1976. Vol.45. P.331-373.
Miller A.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.1984-1992.
Murdoch J.R.// Ibid. 1983. Vol.105. P.2667-2672.
Maggiora G.M., Christoffersen R.E.// Transition state of biochemical processes/ Ed. R.D.Gandour, R.L.Schowen. N.Y.: Plenum Press, 1978. Chap.3.
Burgi H.B., Dunitz J.D., Sheffer E.// J.Amer.Chem.Soc. 1973. Vol.95. P.5065-5067.
Burgi H.B., Dunitz J.D., Lehn J.M., Wipff G.// Tetrahedron. 1974. Vol.30. P.1563-1572.
Burgi H.B., Lehn J.M., Wipff G.// J.Amer.Chem.Soc. 1974. Vol.96. P. 1956-1957.
Lehn J.M., Wipff G.// Helv.chim.acta. 1978. Vol.61. P.1274-1286.
Lehn J.M., Wipff G.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.1347-1354.
Stone A.J., Erekin R.W.// Ibid. P.7185-7192.
Williams I.H., Maggiora G.M., Schowen R.L.// Ibid. P.7831-7839.
Deslongchamps P.// Heterocycles. 1977. Vol.7. P.1271-1317.
Александров С.Л., Антонов В.К.// Молекуляр.биол. 1984. Т.18. С.1576-1582.
Pollack R.M., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1970. Vol.92. P.7190-7194.
McClelland R.A., Santry L.J.// Acc.Chem.Res. 1983. Vol.16. P.394-399.
Bender M.L., Ginger R.D., Kemp K.C.// J.Amer.Chem.Soc. 1954. Vol.76. P.3350-3351.
Bender M.L.// Ibid. 1953. Vol.75. P.5986-5990.
Rogers G.A., Bruce T.C.// Ibid. 1974. Vol.96. P.2481-2488.
Ott H., Frey A.J., Hofmann A.// Tetrahedron. 1963. Vol.19. P.1675-1689.

- Shemyakin M.M., Antonov V.K., Shkrob A.M. et al.// Tetrahedron. 1965. Vol.21. P.3537-3572.
- Bender M.L., Ginger R.D., Untk J.P.// J.Amer.Chem.Soc. 1958. Vol.80. P.1044-1048.
- Bender M.L., Heck H.d'A.// Ibid. 1967. Vol.89. P.1211-1220.
- Deslongchamps P., Barlet R., Taillefer R.J.// Canad.J.Chem.1980. Vol. 58. P.2167-2172.
- Siebocka-Tilk H., Brown R.S., Olekzyk J. // J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.4620-4622.
- Eigen M.// Angew.Chem. 1963. Vol.75. P.489-508.
- Gutman M., Nachliel E., Gershon E.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P. 2937-2941.
- Scheiner S.// Accounts Chem.Res. 1985. Vol.18. P.174-180.
- Hillenbrand E.A., Scheiner S.// J.Amer.Chem. Soc. 1986. Vol.108. P. 7178-7186.
- Cybulek S.M., Scheiner S.// Ibid. 1989. Vol.111. P.23-31.
- Сыркин Я.К., Мусеев И.И.// Успехи химии. 1958. Т.27. С.717-732.
- Williams I.H., Spangler D., Femes D.A. et al. // J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.6619-6621.
- Venkatasubban K.S., Davis K.R., Hogg J.L.// Ibid. 1978. Vol.100. P. 6125-6128.
- Huskey W., Warren C.T., Hogg J.L.// J.Org.Chem. 1981. Vol.46. P.59-63.
- Williams I.H., Spangler D., Femes D.A. et al. // J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.31-40.
- Kirby A.J., McDonald R.S.// J.Chem.Soc.Perkin Trans. Pt II. 1974. P. 1495-1504.
- Lam C.H., Kluger R.H., Catzmadia I.G.// Tetrahedron Lett. 1977. P. 1365-1368.
- Komiyama M., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1979. Vol.76. P. 557-560.
- Ballinger P., Long F.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1960. Vol.82. P.795-798.
- Kirman J.P.// Adv.Enzymol. 1978. Vol.46. P.416-494.
- Kresge A.J.// Pure and Appl.Chem. 1964. Vol.8. P.243-258.
- Hogg J.L., Phillips M.K., Jergens D.E.// J.Org.Chem. 1977. Vol.42. P. 2459-2461.
- Komiyama M., Bender M.L.// Bioorg.Chem. 1979. Vol.8. P.141-145.
- Teeng L., Stewart J.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. P.1273-1275.
- Bergman N.-A., Chiang Y., Kresge A.J.// Ibid. 1978. Vol.100. P.5954-5956.
- Murdoch J.R.// Ibid. 1980. Vol.102. P.71-78.
- Paneth P.// Ibid. 1985. Vol.107. P.7070-7071.
- Kresge A.J.// Ibid. 1980. Vol.102. P.7797-7798.
- Герман Э.Д., Дозонадзе Р.Р.// Протон в химии/ Под ред. Р.Белл. М.: Мир, 1977. С.350-376.
- McClelland R.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.1844-1849.
- Jensen J.L., Jencks W.P.// Ibid. 1979. Vol.101. P.1476-1488.
- Sawyer C.B., Kirsch J.F.// Ibid. 1975. Vol.97. P.1963-1964.
- O'Leary M.H., Marlier J.P.// Ibid. 1979. Vol.101. P.3300-3306.
- Marlier J.P., O'Leary M.H.// J.Org.Chem. 1981. Vol.46. P.2175-2177.
- Deslongchamps P., Atlant P., Frehel D., Malaval A.// Canad.J.Chem. 1972. Vol.50. P.3405-3408.
- Deslongchamps P.// Tetrahedron. 1975. Vol.31. P.2463-2490.
- Lehn J.M., Wipff G.// J.Amer.Chem.Soc. 1974. Vol.96. P.4048-4050.
- Evans Ch. M., Glenn R., Kirby A.J.// Ibid. 1982. Vol.104. P.4706-4707.
- Perrin Ch.L., Nuñez O.// Ibid. 1986. Vol.108. P.5997-6003.
- Jencks W.P.// Ibid. 1972. Vol.94. P.4731-4733.
- Jencks W.P.// Accounts Chem.Res. 1976. Vol.9. P.425-432.
- Guthrie J.P.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.5286-5293.
- Bronsted J.N., Pedersen K.// Ztschr.Phys.Chem. 1924. Vol.108. P.185-190.
- Bruice T.C., Fife T.H., Bruno J.J., Brandon N.E.// Biochemistry.1962. Vol.1. P.7-11.
- Jencks W.P., Gilchrist M.// J.Amer.Chem.Soc. 1962. Vol.84. P.2910-2913.
- Blechler S.S., Taft R.W.// Ibid. 1957. Vol.79. P.4927-4935.
- Schwen R.L., Zworlok G.W.// Ibid. 1966. Vol. 8. P.1223-1225.
- Hammond G.S.// Ibid. 1955. Vol.77. P.334-338.
- Blackburn G.M., Jencks W.P.// Ibid. 1968. Vol.90. P.2638-2645.
- Fersht A.R.// Ibid. 1971. Vol.93. P.3504-3515.
- Bender M.L., Thomas R.J.// Ibid. 1961. Vol.83. P.4183-4189.

- Lienahrd G.E., Jencks W.P.// Ibid. 1965. Vol.87. P.3855-3862.
 Kershner L.D., Schowen R.L.// Ibid. 1971. Vol.93. P.2014-2024.
 Jencks W.P., Carriuolo J.// Ibid. 1960. Vol.82. P.675-681.
 Brutce T.C., Fedor L.R.// Ibid. 1964. Vol.86. P.4886-4897.
 Brutce T.C., Wille R.G.// Ibid. 1965. Vol.87. P.531-536.
 Jencks W.P., Gilchrist M.// Ibid. 1966. Vol.88. P.104-108.
 Brutce T.C., Lapinski R.// Ibid. 1958. Vol.80. P.2265-2267.
 Hupe D.J., Jencks W.P.// Ibid. 1977. Vol.99. P.451-464.
 Whitaker J.R.// Ibid. 1962. Vol.84. P.1900-1904.
 Howard A.E., Kollman P.A.// Ibid. 1988. Vol.110. P.7195-7200.
 Edward J.T., Wong S.C.// Ibid. 1979. Vol.101. P.1807-1809.
 Bender M.L., Neveu M.C.// Ibid. 1958. Vol.80. P.5388-5391.
 Hajdu J., Smith G.M.// Ibid. 1980. Vol.102. P.3960-3962.
 Butler A.R., Gold V.// J.Chem.Soc. 1962. P.1334-1339.
 Bell R.P.// Acid-base catalysis. Oxford: Clarendon Press, 1941. P.94.
 Gandour R.D.// Bioorg.Chem. 1981. Vol.10. P.169-176.
 Allinger N.L., Chang S.H.M.// Tetrahedron. 1977. Vol.33. P.1561-1567.
 Wyness K.G.// J.Chem.Soc. 1958. P.2934-2938.
 Kroll H.// J.Amer.Chem.Soc. 1952. Vol.74. P.2036-2039.
 Bender M.L., Turnquest B.W.// Ibid. 1957. Vol.79. P.1889-1893.
 Westheimer F.H., Shookhoff M.W.// Ibid. 1940. Vol.62. P.269-275.
 Akeson G., Prue J.E.// J.Chem.Soc. 1959. P.103-107.
 Sayre L.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol.108. P.1632-1635.
 Chaffee E., Dasgupta T.P., Harris G.M.// Ibid. 1973. Vol.95. P.4169-4173.
 Buckingham D.A., Engelhardt L.M.// Ibid. 1975. Vol.97. P.5915-5917.
 Martin R.B.// Ibid. 1967. Vol.89. P.2501-2502.
 Putrell J.H., Tlerman T.O.// Science. 1968. Vol.162. P.415-422.
 Nakon R., Reham P.R., Angeltot R.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1974. Vol.96. P.2117-2120.
 Groves J.T., Chambers R.R.// Ibid. 1984. Vol.106. P.630-638.
 Fife Th.H., Przyslas Th.J.// Ibid. 1986. Vol.108. P.4631-4636.
 Buckingham D.A., Keene F.R., Sargeson A.M.// Ibid. 1974. Vol.96. P.4981-4983.
 Groves J.T., Dias R.M.// Ibid. 1979. Vol.101. P.1033-1035.
 Fife Th.H., Przyslas Th.J., Squillacote V.L.// Ibid. P.3017-3026.
 Fife Th.H., Przyslas Th.J.// Ibid. 1980. Vol.102. P.7297-7300.
 Chin J., Banaszczuk M.// Ibid. 1989. Vol.111. P.2724-2726.
 Meriwether L., Westheimer F.H.// Ibid. 1956. Vol.78. P.5119-5123.
 Jencks W.P., Carriuolo J.// J.Biol.Chem. 1959. Vol.234. P.1280-1285.
 Brutce T.C., Schmir G.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1957. Vol.79. P.1663-1667.
 Bender M.L., Turnquest B.W.// Ibid. P.1656-1662.
 Schneider F., Wenck H.// Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 1967. Vol. 348. P.1221-1224.
 Langenbeck W., Mahrwald R.// Chem.Ber. 1957. Vol.90. P.2423-2431.
 Brutce T.C., Schmir G.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1958. Vol.80. P.148-156.
 Brutce T.C., Herz J.L.// Ibid. 1964. Vol.86. P.4109-4116.
 Brutce T.C., Benkovic S.J.// Ibid. P.418-426.
 Cordes E.H., Jencks W.P.// Biochemistry. 1962. Vol.1. P.773-778.
 Kirsch J.F., Jencks W.P.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.837-846.
 Komiyama M., Bender M.L.// Ibid. 1978. Vol.100. P.5977-5978.
 Komiyama M., Bender M.L.// Bioorg.Chem. 1978. Vol.7. P.133-139.
 Kirby A.J., Fersht A.R.// Progr.Bioorg.Chem. 1971. Vol.1. P.1-81.
 Kunitake T.// Bioorg.Chem. 1977. Vol.1. P.153-172.
 Kirby A.J.// Enzyme mechanisms / Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.67-77.
 Bender M.L., Kezdy P.K., Zerner B.// J.Amer.Chem.Soc. 1963. Vol.85. P.3017-3024.
 Brutce T.C., Tanner D.W.// J.Org.Chem. 1965. Vol.30. P.1668-1669.
 Belke C.J., Su S.C.K., Shafer J.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. P.4552-4560.
 Schneider F.// Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 1967. Vol.348. P.1034-1042.
 Garrett E.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1960. Vol.82. P.711-718.
 Fersht A.R., Kirby A.J.// Ibid. 1967. Vol.89. P.4857-4863.
 Fersht A.R., Kirby A.J.// Ibid. P.4853-4857.
 Hurst G.H., Bender M.L.// Ibid. 1971. Vol.93. P.704-711.
 Burrows H.D., Topping R.M.// Chem.Comm. 1970. P.1389-1390.
 Kirby A.J., Lancaster P.W.// J.Chem. Soc.Perkin Trans.Pt.II. 1972. P. 1206-1214.
 Kluger R., Lam C.-H.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.2191-2197.

- Kluger R.K., Chin J., Choy W.W.// Ibid. 1979. Vol.101. P.6976-6980.
 Somayaji V., Keillor J., Brown R.S.// Ibid. 1988. Vol.110. P.2625-2629.
 Menger F.M., Ladika M.// Ibid. P.6794-6796.
 Shorey K.I., Somayaji V., Brown R.S.// Ibid. P.5205-5206.
 Zimmerman S.C., Cramer K.D.// Ibid. P.5906-5908.
 Hulf J.B., Askew B., Duff R.J., Rebek J.// Ibid. P.5908-5909.
 Pife T.H., Przytas T.J.// Ibid. 1982. Vol.104. P.2251-2257.
 Shepartz A., Breslow R.// Ibid. 1987. Vol.109. P.1814-1826.
 Groves J.T., Baron L.A.// Ibid. 1989. Vol.111. P.5442-5448.
 Overberger C.G., Shen Ch.-M.// Ibid. 1971. Vol.93. P.6992-6998.
 Mallick J.M., DisCousa V.T., Yamaguchi M. et al.// Ibid.1984. Vol.106. P.7252-7255.
 Pife Th.H., Bamberg R.J., de Mark B.R.// Ibid. 1978. Vol.100. P.5500-5507.
 Killian F.L., Bender M.L.// Tetrahedron Lett. 1969. P.1255-1258.
 Komiyama M., Roedel Th.R., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1977. Vol.74. P.23-25.
 Bender M.L., Chloupek F., Neveu M.// J.Amer.Chem.Soc. 1958. Vol.80. P.5384-5387.
 Bruce T.C., Sturtevant J.M.// Ibid. 1959. Vol.81. P.2860-2870.
 Ферум Э.// Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
 Fersht A.R., Kirby A.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1968. Vol.90. P.5833-5844.
 Koshland D.E.//J.Theor.Biol. 1962. Vol.2. P.75-86.
 Page M.I., Jencks W.P.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1971. Vol.68. P.1678-1683.
 Page M.I.// Chem.Soc.Rev. 1973. Vol.2. P.295-323.
 Milstein Sh., Cohen L.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.9158-9165.
 Caswell M., Schmitz G.L.// Ibid. 1980. Vol.102. P.4815-4821.
 King M.M., Cohen L.A.// Ibid. 1983. Vol.105. P.2752-2760.
 Dortgo A.E., Houk K.N.// Ibid. 1987. Vol.109. P.3698-3708.
 Menger F.M., Glass L.E.// Ibid. 1980. Vol.102. P.5404-5406.
 Bruce T.C., Benkovic S.J.// Ibid. 1963. Vol.85. P.1-8.
 Александров И.В.// Теорет. и эксперим.химия. 1976. Т.12. С.299-303.
 Листенштейн Г.И. Многоядерные окислительно-восстановительные ферменты. М.: Наука, 1979. С.237.
 Dewar M.J.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1984. Vol.106. P.209-219.
 Knowles J.R., Parsons C.A.// Chem.Comm. 1967. P.755-757.
 Березин И.В., Мартинек К., Яцимирский А.К.// Успехи химии. 1973. Т. 42. С.1729-1756.
 Martinek K., Ostrov A.P., Yatsimirsky A.K., Berezin I.V.// Tetrahedron. 1975. Vol.31. P.709-718.
 Fendler J.H., Fendler E.J.// Catalysis in micellar and macromolecular systems. N.Y.: Acad.Press, 1975.
 Martinek K.// Biochem.Intern. 1989. Vol.18. P.871-893.
 Okahata Y., Ando R., Kunitake T.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.3067-3075.
 Moss R.A., Lee Y.-S., Alwis K.W.// Ibid. 1980. Vol.102. P.6646-6648.
 Ihara Y., Nango M., Kuroki N.// J.Org.Chem. 1980. Vol.45. P.5009-5011.
 Murakami Y., Nakono A., Yoshimatsu A., Fukuya K.// J.Amer.Chem.Soc. 1981. Vol.103. P.728-730.
 Ihara Y., Nango M., Kimura Y., Kuroki N.// Ibid. 1983. Vol.105. P.1252-1255.
 Menger F.M., Whitesell L.C.// Ibid. 1985. Vol.107. P.707-708.
 O'Connor C.J., Tan A.-L.// Austral.J.Chem. 1980. Vol.33. P.747-755.
 Letsinger R.L., Saverdahl T.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1962. Vol.84. P.3122-3127.
 Кири Д.Е., Плужнов С.К., Шотина Т.С. и др. //Высокомолекуляр. соединения.А. 1970. Т.12. С.186-204.
 Klotz I.M.// Adv.Chem.Phys. 1978. Vol.39, P.109-128.
 Klotz I.M.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.14-34.
 Kunitake T., Okahata Y.// Adv.Polym.Sci. 1976. Vol.20. P.217-245.
 Belikov V.M., Latov V.K., Fastovskaya M.I.// J.Mol.Catal. 1980. Vol. 8. P.443-453.
 Латов В.К., Фастовская М.И., Беликов В.М.// Высокомоляр.соединения.А. 1987. Т.29. С.2571-2576.
 Stoddart J.P.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I. Page, A.Williams. L.:

- Royal Soc.Chem., 1987. P.35-55.
 Cram D.J., Katz H.E.// J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.135-137.
 Bender M.L.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.56-66.
 Czarniecki M.F., Breslow R.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.7771-7772.
 D'Souza V.T., Hanabuss K., O'Leary T. et al.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1985. Vol.129. P.727-732.
 D'Souza V.T., Lu X.L., Ginder R.D., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1987. Vol.84. P.673-674.
 Bülow L., Mosbach K.// FEBS Lett. 1987. Vol.210. P.147-152.
 Atassi M.Z.// Biochem.J. 1985. Vol.226. P.477-485.
 Menger F.M., Ladika M.// J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.3145-3146.
 Segel I.H.// Enzyme kinetics. N.Y.: J.Wiley and Sons, 1975.
 Wong J.T.-P.// Kinetics of enzyme mechanisms. L.: Acad.Press, 1975.
 Fromm H.J.// Initial rate enzyme kinetics. Berlin: Springer, 1975.
 Cornish-Bowden A.// Principles of enzyme kinetics. L.: Butterworths, 1976.
 Березин И.В., Клесов А.А.// Практический курс химической и ферментативной кинетики. М: Изд-во МГУ, 1976.
 Cleland W.W.// Adv.Enzymol. 1977. Vol.45. P.273-388.
 Диксон М., Уэбб Э.// Ферменты. М.: Мир, 1982. С.199-235.
 Michaelis L., Menten M.L.// Biochem.Ztschr. 1913. Vol.49. P.333-341.
 Briggs G.E., Haldane J.B.S.// Biochem.J. 1925. Vol.19. P.338-343.
 Symbolism and terminology in enzyme kinetics recommendation (1981)// Europ.J.Biochem. 1982. Vol.128. P.281-291.
 Symbolism and terminology in enzyme kinetics// Biochem.J. 1983. Vol. 213. P.561-571.
 Zerner B., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.3669-3674.
 Antonov V.K., Rumsh L.D., Tikhoděeva A.G.// FEBS Lett. 1974. Vol.46. P.29-33.
 King E.L., Altman C.// J.Phys.Chem. 1956. Vol.60. P.1365-1372.
 Fromm H.J.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1970. Vol.40. P.692-699.
 Chou K.C.// Europ.J.Biochem. 1980. Vol.113. P.195-198.
 Попова С.В., Гольдштейн Б.Н.// Молекуляр.биол. 1982. Т.16. С.1271-1278.
 Litnieweaver H., Burk D.// J.Amer.Chem.Soc. 1934. Vol.56. P.658-670.
 Hofstee B.H.J.// Nature. 1959. Vol.184. P.1296-1298.
 Nimmo I.A., Atkins G.L.// Biochem.J. 1974. Vol.141. P.913-914.
 Cornish-Bowden A.// Ibid. 1975. Vol.149. P.305-312.
 Mannervik B., Jakobson I., Warholm M.// Biochim. et biophys. acta. 1979. Vol.567. P.43-48.
 Matyska L., Kovář J.// Biochem.J. 1985. Vol.231. P.171-177.
 Darvey I.G., Williams J.P.// Biochim. et biophys.acta. 1964. Vol.85. P.1-10.
 Boeker E.A.// Biochem.J. 1985. Vol.226. P.29-36.
 Клесов А.А., Березин И.В.// Биохимия. 1972. Т.37. С.170-183.
 Duggleby R.G.// Biochem.J. 1986. Vol.235. P.613-615.
 Evans S.A., Olson S.T., Shore J.D.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P. 3014-3017.
 Hartley B.S., Kilby B.A.// Biochem.J. 1954. Vol.56. P.288-297.
 Ascenzi P., Menegatti E., Guarnieri G.// Biochim. et biophys.acta. 1987. Vol.915. P.421-425.
 Livingston D.C., Brocklehurst J.R., Cannon J.F. et al.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.4298-4306.
 Leytus S.P., Patterson W.L., Mangel W.F.// Biochem.J. 1983. Vol.215. P.253-260.
 Mehlich A., Beckman J., Wenzel H.R., Tschesche H.// Biochim. et biophys.acta. 1988. Vol.957. P.420-429.
 Roddy D.B.// Automated enzyme assays. Amsterdam; L.: North-Holland, 1970.
 Roffman S., Sanocka U., Troll W.// Anal.Biochem. 1970. Vol.36. P.11-17.
 Latt S.A., Auld D.S., Vallee B.L.// Ibid. 1972. Vol.50. P.56-62.
 Sachdev G.P., Brownstein A.D., Fruton J.S.// J.Biol.Chem. 1973. Vol.248. P.6292-6299.
 Spencer P.W., Titus J.S., Spencer R.D.// Anal.Biochem. 1975. Vol.64.

- P.556-566.
 Zimmerman M., Ashe B., Yurewicz E.C., Patel G.// Ibid. 1977. Vol.78. P.47-51.
 Furukata C., Senma T., Saito D. et al.// Ibid. 1978. Vol.84. P.479-485.
 Zimmerman M., Quigley J.P., Ashe B. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1978. Vol.75. P.750-753.
 Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C.// Anal.Biochem. 1979. Vol.99. P.53-64.
 Green G.D.J., Shaw E.// Ibid. Vol.93. P.223-226.
 Garesse R., Castell J.V., Vallejo C.G., Marco R.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.99. P.253-259.
 Branchini B.R., Salituro F.G., Hermes J.D., Post N.J.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1980. Vol.97. P.334-339.
 Varant J., Johnson K., Kaplan J.// Anal.Biochem. 1980. Vol.107. P.377-384.
 Andrews A.T.// FEBS Lett. 1982. Vol.141. P.207-210.
 Takamiya S., Ohshtima T., Tantzawa K., Soda K.// Anal.Biochem. 1983. Vol.130. P.266-270.
 Pohl J., Baudyš M., Kostka V.// Ibid. Vol.133. P.104-109.
 Florentin D., Sassi A., Roques B.P.// Ibid. 1984. Vol.141. P.62-69.
 Kuromitsu K., Shitokawa Y., Abe O., Izumiya N.// Ibid. 1985. Vol.151. P.534-539.
 Green J.D.// Ibid. 1986. Vol.152. P.83-88.
 Hwang S.Y., Kingsbury W.G., Hall N.M. et al.// Ibid. Vol.154. P.552-558.
 Kokotos G., Tzougraki Ch.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1986. Vol.28. P.186-191.
 Bratovanova E.K., Petkov D.D.// Anal.Biochem. 1987. Vol.162. P.213-218.
 Beattie R.E., Guthrie D.J.S., Elmore D.T. et al.// Biochem.J. 1987. Vol.242. P.281-283.
 Kawabata S.-i., Miura T., Morita T. et al.// Europ.J.Biochem. 1988. Vol.172. P.17-25.
 Stack M.S., Gray R.D.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.4277-4281.
 Rooster J., Barres E., Hutton J.C., Bicknell R.J.// Anal. Biochem. 1989. Vol.178. P.27-31.
 Janska H., Light A.// Ibid. Vol.176. P.132-136.
 Антонов В.К.// Биооргани.химия. 1980. Т.6. С.805-839.
 Cleland W.W.// Accounts Chem.Res. 1975. Vol.8. P.145-151.
 Bernhard S.A.// J.Cell.Comp.Physiol.Suppl.1. 1959. Vol.54 P.256-260.
 Hein G.E., Niermann C.// J.Amer.Chem.Soc. 1962. Vol.84. P.4495-4503.
 Березин И.В., Казанская Н.Ф., Клесов А.А.// Биохимия. 1971. Т.36. С.227-235.
 Keleti T.// FEBS Lett. 1986. Vol.208. P.109-112.
 Gutfreund H., Hammond B.R.// Biochem.J. 1959. Vol.73. P.526-530.
 Bender M.L., Clement G.E., Gunter C.R., Kezdy F.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.3697-3703.
 Berezin I.V., Kazanskaya N.F., Klyosov A.A.// FEBS Lett. 1971. Vol.15. P.121-124.
 Dorovska-Taran V., Raykova D.// Biochim. et biophys.acta. 1980. Vol.615. P.509-513.
 Мартинек К., Яцимирский А.К., Березин И.В.// Молекуляр.биол. 1971. Т.5. С.96-109.
 Martinek K., Klyosov A.A., Kazanskaya N.F., Berezin I.V.// Intern.J. Chem.Kinet. 1974. Vol.6. P.801-811.
 Boyer P.D., Silverstein E.// Acta chem.scand. 1963. Vol.17. P.195-212.
 Cleland W.W.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.3220-3224.
 Лякишева А.Г., Гиномджан Л.М., Антонов В.К.// Молекуляр.биол. 1973. Т.7. С.810-816.
 Гурова А.Г., Гиномджан Л.М., Антонов В.К.// Там же. 1977. Т.11. С.1155-1159.
 Антонов В.К., Гиномджан Л.М., Гурова А.Г.// Там же. С.1160-1166.
 Гиномджан Л.М., Луценко Н.Г.// Биохимия. 1972. Т.37. С.101-111.
 Etgen M., Hammes G.G.// Adv.Enzymol. 1963. Vol.25. P.1-38.
 Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry / Ed. B.Chance, R.H.Eisenhardt, Q.H.Gibson, K.K.Lonberg-Holm. N.Y.: Acad.Press, 1964.
 Hammes G.G., Schimmel P.R.// The Enzymes. / Ed. P.Boyer. N.Y.; L.: Acad.Press, 1970. Vol.2. P.67-114.

- Хеммис Г.// Методы исследования быстрых реакций. М.: Мир, 1977.
- Курганов. Б.И.// Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978.
- Клесов А.А., Вэлли Б.Л.// Биоорг.химия. 1977. Т.3. С.806-815.
- Hill R.// Proc.Roy.Soc.London.B. 1925. Vol.100. P.419-425.
- Симонова Г.В., Ливанова Н.Б., Курганов Б.И.// Молекуляр.биол. 1969. Т.3. С.768-784.
- Bardsley W.G., Wright A.J.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.165. P.163-182.
- Hill T.L., Levitzki A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1980. Vol.77. P.5741-5745.
- Курганов Б.И.// Молекуляр.биол. 1974. Т.8. С.525-535.
- Haldane J.B.S.// Enzymes. L.: Longmans, 1930.
- Schechter J., Berger A.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1967. Vol. 27. P.157-162.
- The enzymes. Vol.3 / Ed. P.D.Boyer. N.Y.; L.: Acad.Press, 1971.
- Spickett R.G.W.// Chem.and Ind. 1971. P.83-94.
- Мосолов В.В.// Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971.
- Clement G.E.// Progress in bioorganic chemistry / Ed. E.T.Kaiser, F. J.Kezdy. N.Y.: Wiley, 1973. Vol.2. P.177-238.
- Pruton J.S.// Adv.Enzymol. 1976. Vol.44. P.1-35.
- Lasch J.// Ophthalm.Res. 1979. Vol.11. P.372-376.
- Harper E.// Annu.Rev.Biochem. 1980. Vol.49. P.1063-1078.
- Dahlqvist U., Wahlby S.// Biochim. et biophys.acta. 1975. Vol.391. P. 410-414.
- Crestfield A.M., Moore S., Stein W.H.// J.Biol.Chem. 1963. Vol.238. P.622-627.
- Naughton M.A., Sanger F.// Biochem.J. 1961. Vol.78. P.156-163.
- Johansen J.T., Ottesen M.// C.r.trav.Lab.Carlsberg. 1968. Vol.36. P. 265-273.
- Kärgel H.-J., Dehtner R., Etzold G. et al. // FEBS Lett. 1980. Vol. 114. P.257-260.
- Ryle A.P., Leclerc J., Falla P.// Biochem.J. 1968. Vol.110. P.4p.
- Klilova H., Kell B.// Coll.Czechosl.Chem.Comm. 1968. Vol.33. P.131-140.
- Reichelt D., Jacobson E., Haschen R.J.// Biochim. et biophys. acta. 1974. Vol.341. P.15-26.
- Zerner B., Bond R.P.M., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.3674-3679.
- Seely J.H., Benoitton N.L.// Canad.J.Biochem. 1970. Vol.48. P.1122-1131.
- Thompson R.C., Blout E.R.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1970. Vol.67. P. 1734-1740.
- Thompson R.C., Blout E.R.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.57-65.
- Gertler A., Weiss Y., Burstein Y.// Ibid. 1977. Vol.16. P.2709-2715.
- Baker E.N., Boland M.J., Calder P.C., Hardman M.J.// Biochim. et biophys.acta 1980. Vol.616. P.30-34.
- Inouye K., Pruton J.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.187-188.
- Auld D.S., Holmquist B.// Biochemistry. 1974. Vol.13. P.4355-4361.
- Keung W.-M., Holmquist B., Riordan J.F.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1980. Vol.96. P.506-513.
- McFarlane N.D., Brammar W.J., Clarke P.H.// Biochem.J. 1965. Vol.95. P.240.
- Woods M.J., Findlater J.D., Orst B.A.// Biochim. et biophys. acta. 1979. Vol.567. P.225-237.
- Margolin A.L., Švedas V.K., Berezin I.V.// Ibid. 1980. Vol.616. P. 283-289.
- Suda H., Yamamoto K., Aoyagi T., Umezawa H. // Ibid. Vol.616. P.60-67.
- Fukuda M., Kunugi S.// J.Biochem. 1987. Vol.101. P.233-240.
- Rumsh L.D., Volkova L.I., Antonov V.K.// FEBS Lett. 1970. Vol.9. P. 64-66.
- Yasutake A., Miyazaki K., Aoyagi H. et al.// Ibid. 1979. Vol.100. P. 241-243.
- Yasutake A., Miyazaki K., Aoyagi H. et al.// Intern. J. Peptide and Protein Res. 1980. Vol.16. P.61-65.
- Ohno 'M., Izumita N.// Bull.Chem.Soc.Japan. 1965. Vol.38. P.1831-1840.
- Kenner G.W., Laird A.H.// Chem.Comm. 1965. P.305-306.
- Kellova H., Blaha K., Kell B.// Europ.J.Biochem. 1968. Vol.4. P.442-447.
- Tarada S., Kato T., Izumita N.// Ibid. 1975. Vol.52. P.273-282.
- Антонов В.К., Ванюкова Н.А.// Биохимия. 1970. Т.35. С.202-204.
- Powers J.C., Carroll D.L.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975.

Vol.67. P.639-644.

Jupton B.F., Carroll D.L., Tuhy P.M. et al.// J.Biol.Chem. 1984. Vol. 259. P.4279-4287.

King S.W., Lum V.R., Fife Th.H.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.2294-2300.

Lowe G., Williams A.// Biochem.J. 1965. Vol.96. P.189-193.

Franklater A., Kezdy F.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. 4039-4043.

Vencill Ch. F., Rasmick D., Crumley K.V. et al.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.3149-3157.

Beattie R.E., Elmore D.T., Williams C.H., Guthrie D.J.S.// Ibid.1987. Vol.25. P.285-288.

Folgar L.// Acta biochim. et biophys.acad.sci.hung. 1972. Vol.7. P. 29-34.

McRae B.J., Kurachi K., Helmark R.L. et al.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.7195-7206.

Tanaka T., McRae B.J., Cho K. et al.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P. 13552-13557.

Kam C.-M., McRae B.J., Harper J.W. et al.// Ibid. 1987. Vol.262. P. 3444-3451.

Earle W.E.M., Niemann C.// J.Amer.Chem.Soc. 1959. Vol.81. P.2204-2208.

Barrett A.J.// Enzyme regulation and mechanism of action / Ed.P.Mildner, B.Ries. Oxford: Pergamon Press, 1980. P.307-315.

Towatari T., Katsumura N.// J.Biochem. 1983. Vol.93. P.1119-1128.

Marks N., Berg M.J., Benuck M.// Arch. Biochem. and Biophys. 1986. Vol.249. P.489-499.

Takahashi T., Dahdarant A.H., Tang J.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.10952-10957.

Skidgel R.A., Erdös E.G.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P. 1025-1029.

Kunugi S., Fukuda M., Hayashi R.// Europ.J.Biochem. 1985. Vol.153. P. 37-40.

Johnson B.A., Aswad D.W.// Biochemistry. 1990. Vol.29. P.4373-4380.

Alecio H.R., Dann M.L., Lowe G.// Biochem.J. 1974. Vol.141. P.495-501.

Fujitwara K., Kobayashi R., Tsuru D.// Biochim. et biophys.acta. 1979. Vol.570. P.140-148.

Nomura K.// FEBS Lett. 1986. Vol.209. P.235-237.

Heins J., Welker P., Schonlein Ch. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1988. Vol.954. P.161-169.

Kuroda K., Akanuma H., Sukenaga Y. et al.// J.Biochem. 1980. Vol.87. P.1690-1701.

Grant D.A.W., Harmon-Taylor J.// Biochim. et biophys.acta. 1979. Vol. 567. P.207-215.

Christensen U., Ipeen H.-H.// Ibid. Vol.569. P.177-183.

Lottenberg R., Hall J.A., Blinder M. et al.// Ibid. 1983. Vol.742. P. 539-557.

Castillo M.J., Kurachi K., Nishino N. et al.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.1021-1029.

Stone S.R., Hofsteenge J.// Biochem.J. 1985. Vol.230. P.497-502.

Lottenberg R., Hall J.A., Pautler E. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1986. Vol.874. P.326-336.

Bezeaud A., Guitlin M.-C.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.3576-3581.

McRae B.J., Lin T.-Y., Powers J.C.// Ibid. 1981. Vol.256. P.12362-12366.

Steiner D.F., Docherty K., Carroll R.// J.Cell.Biochem. 1984. Vol.24. P.121-130.

Schwartz T.W.// FEBS Lett. 1986. Vol.200. P.1-10.

Sugimura K.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1988. Vol.153. P.753-759.

Bayle-Lacoste M., Tinguy-Moreau E.D., Geoffre S., Neuzil E.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1987. Vol.29. P.392-405.

Lowbridge J., Fruton J.S.// J.Biol.Chem. 1974. Vol.249. P.6754-6761.

Mattis J.A., Fruton J.S.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.2191-2194.

Sasaki T., Kikuchi T., Yumoto N. et al.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.12489-12494.

Zucker S., Buttle D.J., Nicklin M.J.H., Barrett A.J.// Biochim. et biophys.acta. 1985. Vol.828. P.196-204.

Allen M.P., Yamada A.H., Carpenter P.H.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.3778-3783.

Bunting J., Kabir S.H.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.2775-2780.

Baumann W.K., Bizzozero S.A., Dutler H.// FEBS Lett. 1970. Vol.8. P.

257-261.

- Bitzozero S.A., Baumann W.K., Dutler H.// *Europ.J.Biochem.* 1982. Vol. 122. P.251-258.
- Harper J.W., Cook R.R., Roberts J. et al.// *Biochemistry.* 1984. Vol. 22. P.2995-3002.
- Yoshida N., Everitt M.T., Neurath H. et al.// *Ibid.* 1980. Vol.19. P. 5799-5804.
- Powers J.C., Tanaka T., Harper J.W. et al.// *Ibid.* 1985. Vol.24. 2048-2058.
- Vlsser S., Rootfen P.J.v., Schattenkerk C., Kerling K.E.T.// *Biochim. et biophys.acta.* 1977. Vol.481. P.171-176.
- Morihara K.// *Proteinases and their inhibitors: Proc. Intern. Sy (Portorož, Yugosl.)*/ Ed. V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Mlad Oxford: Pergamon Press, 1981. P.213-222.
- Martin P.// *Biochim. et biophys.acta.* 1984. Vol.791. P.28-36.
- Dunn B.M., Jimenez M., Parten B.F. et al.// *Biochem.J.* 1986. Vol.237 P.899-906.
- Johnson E.K., Lamkin R.M., Jordan K.J. et al.// *Intern.J.Peptide and Protein Res.* 1987. Vol.30. P.170-176.
- Waxman L., Goldberg A.L.// *J.Biol.Chem.* 1985. Vol.260. P.12022-12033.
- Woo K.M., Chung W.J., Ha D.B. et al.// *Ibid.* 1989. Vol.264. P.2088-2091.
- Driscoll J., Goldberg A.L.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1989. Vol.86. P. 787-791.
- Kotler M., Danho W., Katz R.A. et al.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P. 3428-3435.
- Krausslich H.-G., Ingraham R.H., Skoog M.T. et al.// *Proc.Nat.Acad. Sci.USA.* 1989. Vol.86. P.807-811.
- Atlas D., Berger A.// *Biochemistry.* 1972. Vol.11. P.4719-4722.
- Bauer C.-A., Thompson R.C., Blout E.R.// *Ibid.* 1976. Vol.15. P.1296-1299.
- Thomson A., Kapadia Sh.B.// *Europ.J.Biochem.* 1979. Vol.102. P.111-116.
- Del Mar E.G., Largman C., Brodrick J.W. et al.// *Biochemistry.* 1980. Vol.19. P.468-472.
- Stein R.L., Strimpler A.M., Hort H., Powers J.C.// *Ibid.* 1987. Vol. 26. P.1301-1305.
- Blith J.G., Dirrig S., Jung M.-L. et al.// *Biochim. et biophys. acta.* 1989. Vol.994. P.64-74.
- Morihara K., Oka T., Tsuzuki H.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1970. Vol.138. P.515-525.
- Bromme D., Peters K., Fink S., Pittkau S.// *Ibid.* 1986. Vol.244. P. 439-446.
- Weingarten H., Feder J.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1986. Vol. 139. P.1184-1187.
- Mookhtiar K.A., Steinbrink D.R., Wart H.E.v.// *Biochemistry.* 1985. Vol.24. P.6527-6533.
- Malfroy B., Schwartz J.-C.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1982. Vol.106. P.276-285.
- Buttle D.J., Rittonja A., Pearl L.H. et al.// *FEBS Lett.* 1990. Vol. 260. P.195-197.
- Howard J., Drapeau G.R.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1972. Vol.69. P. 3506-3509.
- Ревина Л.П., Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н. и др.// *Биохимия.* 1989. Т.54. С.846-850.
- Heijne G.v.// *J.Mol.Biol.* 1985. Vol.184. P.99-105.
- Bitzozero S.A., Baumann W.K., Dutler H.// *Europ.J.Biochem.* 1975. Vol. 58. P.167-176.
- Fisher J., Belasco J.G., Khosla S., Knowles J.R.// *Biochemistry.* 1980. Vol.19. P.2895-2901.
- Matagne A., Misselyn-Bauduin A.-M., Joris B. et al.// *Biochem.J.* 1990. Vol.265. P.131-146.
- Baumann W.K., Bitzozero S.A., Dutler H.// *Europ.J.Biochem.* 1973. Vol. 39. P.381-391.
- Bauer C.-A., Thompson R.C., Blout E.R.// *Biochemistry.* 1976. Vol.15. P.1291-1295.
- Bauer C.-A.// *Europ.J.Biochem.* 1980. Vol.105. P.565-570.
- Hill Ch.R., Tomalin G.// *Arch.Biochem. and Biophys.* 1983. Vol.221. P. 324-328.
- Lobo A.P., Wos J.D., Yu Sh.M., Lowson W.B.// *Ibid.* 1976. Vol.177. P. 235-244.

- Blizzozero S.A., Dutler H.// Ibid. 1987. Vol.256. P.662-676.
 Fiedler F.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.163. P.303-312.
 Lonsdale-Eccles J.D., Hogg D.H., Elmore D.T.// Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol.612. P.395-400.
 Кибуireв В.К., Романова В.И., Серебряный С.Б.// Биохимия. 1983. Т.48, С.937-943.
 Marsh H.C., Melnwald Y.C., Thannhauser T.W., Scheraga H.A.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.4170-4174.
 Cho K., Tanaka T., Cook R.R. et al.// Ibid. 1984. Vol.23. P.644-650.
 Pesquero J.L., Boschov P., Oliveira M.C.F., Palva A.C.M.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1982. Vol.108. P.1441-1446.
 Levinson P.R., Tomalin G.// Biochem.J. 1982. Vol.203. P.299-302.
 Atlas D., Levitt S., Schechter J., Berger A.// FEBS Lett. 1970. Vol. 11. P.281-283.
 Renaud A., Lestienne P., Hughes D.L. et al.// J.Biol.Chem. 1983. Vol. 258. P.8312-8316.
 Stein R.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.5767-5775.
 Schellenberger V., Schellenberger U., Mittin Y., Jakubke H.-D.//Europ. J.Biochem. 1989. Vol.179. P.161-163.
 Kaplan H., Whitaker D.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.3352-3353.
 Morthara K., Tsuzuki H.// Arch.Biochem. and Biophys. 1971. Vol.146. P.291-296.
 Bratovanova E.K., Petkov D.D.// Biochem.J. 1987. Vol.248. P.957-960.
 Medzhradszky K., Voynick I.M., Medzhradszky-Schweitzer H., Fruton J. S.// Biochemistry. 1970. Vol.9. P.1154-1162.
 Raymond M.N., Garnier J., Bricas E. et al.// Biochimie. 1972. Vol.54. P.145-154.
 Sampath-Kumar P.S., Fruton J.S.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1974. Vol. 71. P.1070-1072.
 Fruton J.S.// Isr.J.Chem. 1974. Vol.12. P.505-513.
 Auffret C.A., Ryle A.P.// Biochem.J. 1979. Vol.179. P.239-246.
 Dunn B.M., Kammermann B., McCurry K.R.// Anal.Biochem. 1984. Vol.138. P.68-73.
 Dunn B.M., Valler M.J., Rolph C.E. et al.// Biochim. et biophys.acta. 1987. Vol.913. P.122-130.
 Stammers D.K., Dann J.G., Harris C.J., Smith D.R.// Arch.Biochem. and Biophys. 1987. Vol.258. P.413-420.
 Burton J., Quinn T.// Biochim. et biophys. acta. 1988. Vol.952. P.8-12.
 Kotler M., Katz R.A., Danho W. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1988. Vol.85. P.4185-4189.
 Morthara K., Tsuzuki H.// Europ.J.Biochem. 1970. Vol.15. P.374-380.
 Hersh L.B., Morthara K.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.6433-6437.
 Kania R., Santiago N.A., Gray G.M.// Ibid. 1977. Vol.252. P.4929-4934.
 Ötvös L., Moravcsik E., Mady G.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1971. Vol.44. P.1056-1064.
 Matsuda K.// J.Biochem. 1976. Vol.80. P.659-669.
 Walter R., Yoshimoto T.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4139-4144.
 Cheung H.-S., Wang F.-L., Ondetti M.A. et al.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.401-407.
 De Camargo A.C.M., Da Fonseca M.J.V., Caldo H., de Morais Carvalho K.// Ibid. 1982. Vol.257. P.9265-9267.
 Fischer G., Heins J., Barth A.// Biochim. et biophys.acta. 1983. Vol. 742. P.452-462.
 Deschodt-Lanckman M., Strosberg A.D.// FEBS Lett. 1983. Vol.152. P. 109-113.
 Matsas R., Turner A.J., Kenney A.J.// Ibid. 1984. Vol.175. P.124-128.
 Connelly J.C., Skidgel R.A., Schulz W.W. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1985. Vol.82. P.8737-8741.
 Harada M., Fukasawa K., Hiraoaka B.Y. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol.830. P.341-344.
 Maziak L., Lajolo G., Belleau B.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol.108. P. 182-183.
 Gluschkof P., Gomez S., Lepage A. et al.// FEBS Lett. 1988. Vol. 234. P.149-152.
 Morthara K., Oka T.// Arch. Biochem. and Biophys. 1973. Vol.156. P. 764-771.
 Morthara K., Oka T.// FEBS Lett. 1973. Vol.33. P.54-56.
 Gertler A., Hofmann T.// Canad.J.Biochem. 1970. Vol.48. P.384-386.

- Fruton J.S.// *Proteases and biological control* / Ed.E.Reich, D.B.Rifkin, E.Shaw. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P.33-50.
- Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К.// *Биоорганическая химия*. 1977. Т.3. С.1663-1670.
- Hill C.R., Tomalin G.// *Biochim. et biophys.acta*. 1981. Vol.660. P.65-72.
- Mihalyi E.// *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies*: In 2 vol. 2nd ed. West Palm Beach: CRC Press, 1978.
- Hershko A., Ciechanover A.// *Annu.Rev.Biochem.* 1982. Vol.51. P.335-364.
- Bennett W.S., Huber R.// *CRC.Crit.Rev.Biochem.* 1984. Vol.15. P.291-384.
- Mayer R.J., Doherty P.// *FEBS Lett.* 1986. Vol.198. P.181-193.
- Bek E., Berry R.// *Biochemistry*. 1990. Vol.29. P.178-183.
- Linderstrom-Lang K.V.// *Proteins and enzymes*. Lane medical lectures. Stanford: Stanford Univ.Press, 1952. Vol.6. P.53-72.
- Vorob'ev M.M., Paskolova S.V., Vitt S.V., Belikov V.M.// *Die Nahrung*. 1986. Vol.30. P.995-1001.
- Imoto T., Yamada H., Ueda T.// *J.Mol.Biol.* 1986. Vol.190. P.647-649.
- Wright H.T.// *Europ.J.Biochem.* 1977. Vol.73. P.567-578.
- Bicknell R., Schaeffer A., Auld D.S. et al.// *Biochem. and Biophys. Res.Comm.* 1985. Vol.133. P.787-793.
- Linderstrom-Lang K.V., Offesen M.// *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 1949. Vol.26. P.403-412.
- Anderson L.E., Walsh K.A., Neurath H.// *Biochemistry*. 1977. Vol.16. P.3354-3360.
- Light A., Savithri H.S., Iltis J.J.// *Anal.Biochem.* 1980. Vol.106. P.199-206.
- Harries R.B.// *Arch.Biochem. and Biophys.* 1989. Vol.275. P.315-333.
- Mentlein R.// *FEBS Lett.* 1988. Vol.234. P.251-256.
- Ревина Л.П., Вахитова Э.А., Бартонова Л.А. и др.// *Биоорганическая химия*. 1975. Т.1. С.958-964.
- Roham M., Nicolas P., Cohen P.// *FEBS Lett.* 1986. Vol.207. P.1-6.
- Bewly Th. A., Li C.H.// *Biochemistry*. 1985. Vol.24. P.6568-6571.
- Ogasahara K., Tsunasawa S., Soda Y. et al.// *Europ.J.Biochem.* 1985. Vol.150. P.17-21.
- Fontana A., Passina G., Vita C. et al.// *Biochemistry*. 1986. Vol.25. P.1848-1851.
- Rodonov M.A., Galaktionov S.G., Akhrem A.A.// *FEBS Lett.* 1987. Vol.223. P.402-404.
- Novotny J., Bruccoleri R.E.// *Ibid.* Vol.211. P.185-189.
- Visser S., Rootjen P.J.v., Slangen Ch.J.// *Europ.J. Biochem.* 1980. Vol.108. P.415-421.
- Carles Ch., Ribadeau-Dumas B.// *Biochemistry*. 1984. Vol.23. P.6839-6843.
- Carles Ch., Martin P.// *Arch.Biochem. and Biophys.* 1985. Vol.242. P.411-416.
- Carles Ch., Dumas B.R.// *FEBS Lett.* 1985. Vol.185. P.282-286.
- Droese H.B., Foltmann B.// *Biochim. et biophys.acta*. 1989. Vol.995. P.221-224.
- Visser S., Slangen Ch.J., Rootjen P.J.v.// *Biochem.J.* 1987. Vol.244. P.553-558.
- Сапро М.Г., Андреева Н.С., Бланделл Т.Л.// *Молекуляр. биол.* 1987. Т.21. С.1582-1589.
- Higgins D.L., Lewis S.D., Shafer J.A.// *J.Biol.Chem.* 1983. Vol.258. P.9276-9282.
- Estell D.A., Wilson K.A., Laskowski M.// *Biochemistry*. 1980. Vol.19. P.131-137.
- Abita J.F., Delaage M., Lazdunski M., Sourda J.// *Europ.J.Biochem.* 1969. Vol.8. P.314-324.
- Mater M., Austen K.F., Spragg J.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1983. Vol.80. P.3928-3932.
- Marcus S., Baratt J., Desnuelle P.// *J.Biol.Chem.* 1971. Vol.246. P.5031-5039.
- Perlman D., Halvorsen H.O.// *J.Mol.Biol.* 1983. Vol.167. P.391-409.
- Zhu H.-Y., Dalbey R.E.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P.11833-11838.
- Жирнов О.П.// *Молекуляр. биол.* 1988. Т.22. С.581-600.
- Hershko A., Leshinsky E., Ganoth D., Heller H.// *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*. 1984. Vol.81. P.1619-1623.
- Evans A.C., Wilkinson K.D.// *Biochemistry*. 1985. Vol.24. P.2915-2923.
- Hershko A., Heller H., Eytan E. et al.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1984. Vol.81. P.7021-7025.

- Matthews W., Tanaka K., Driscoll J. et al.// Ibid. 1989. Vol.86. P. 2597-2601.
- Schulze I.T., Colowick S.P.// J.Biol.Chem. 1969. Vol.244. P.2306-2310.
- Graves D.J., Mann A.S., Phillip G., Oliveira R.J.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.6090-6098.
- Miles E.W., Higgins W.// Limited proteolysis in microorganisms/ Ed. G.N.Cohen, H.Holzer. Wash.(D.C.): NIH Publ., 1978. P.225.
- Tang J.// Nature. 1963. Vol.199. P.1094-1095.
- Hill R.L.// Adv.Protein Chem. 1965. Vol.20. P.37-107.
- Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К.// Биорган.химия. 1976. Т.2. С.803-810.
- Powers J.C., Harley D., Myers D.V.// Adv. Exp. Med. and Biol. 1977. Vol.95. P.141-158.
- Free S.M., Wilson J.M.// J.Med.Chem. 1964. Vol.7. P.395-399.
- Pozsgay M., Gaspar R., Bajusz S., Elödi P.// Acta biochim. et biophys. acad.sci.hung. 1978. Vol.13. P.184-187.
- Pozsgay M., Gaspar R., Bajusz S., Elödi P.// Europ.J. Biochem. 1979. Vol.95. P.115-119.
- Marosy K., Szabo G.Cs., Pozsgay M., Elödi P.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1980. Vol.96. P.762-769.
- Pozsgay M., Szabo G.Cs., Bajusz S. et al.// Europ.J.Biochem. 1981. Vol.115. P.491-495.
- Knowles J.R.// J.Theor.Biol. 1965. Vol.9. P.213-228.
- Berezin I.V., Klyosov A.A., Martinek K.// Chem.Rev.Sec.B (USSR). Chur (Schweiz.): Harwood Acad.Publ., 1979. Vol.1. P.206-277.
- Клосов А.А., Березин И.В.// Ферментативный катализ. М.: Изд-во МГУ, 1980.
- Dorowska V.N., Varfolomeyev S.D., Kazanskaya N.F., Klyosov A.A. // FEBS Lett. 1972. Vol.23. P.122-124.
- Клосов А.А., Вэли Б.Л., Березин И.В.// ДАН СССР. 1977. Т.234. С. 964-967.
- Milstein J.B.M., Fife Th. H.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.623-627.
- Kogan R.L., Fife Th.H.// Ibid. 1985. Vol.24. P.2610-2614.
- Fife Th.H., Milstein J.B.// Ibid. 1967. Vol.6. P.2901-2907.
- Berezin I.V., Kazanskaya N.F., Klyosov A.A., Martinek K.// FEBS Lett. 1971. Vol.15. P.125-128.
- Hansch C.// J.Org.Chem. 1972. Vol.37. P.92-95.
- Dupals A., Bechet J.-J., Roucoux C.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P. 2559-2566.
- Hansch C., Grieco C., Sillipo C., Vittoria A.// J.Med.Chem. 1977. Vol.20. P.1420-1435.
- Hansch C., Smith R.N., Rockoff A. et al.// Arch.Biochem. and Biophys. 1977. Vol.183. P.383-392.
- Hansch C., Coate E.// J.Pharm.Sci. 1970. Vol.59. P.731-748.
- Мартинек К., Доровска В.Н., Варфоломеев С.Д.// Биохимия. 1972. Т.37. С.1245-1250.
- Bender M.L., Killheffer J.V., Kezdy F.J.// J.Amer. Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.5330-5331.
- Seydoux F., Yon J.// Europ.J.Biochem. 1967. Vol.3. P.42-56.
- Клосов А.А.// Биорган.химия. 1977. Т.3. С.1100-1110.
- Клосов А.А., Федосеев В.Н., Киррет О.Г.// Биохимия. 1977. Т.42. С. 1939-1951.
- Carotti A., Smith R.N., Wong S. et al.// Arch.Biochem. and Biophys. 1984. Vol.229. P.112-125.
- Pank M., Kirret O., Paberit N., Aaviksaar A.// FEBS Lett. 1982. Vol. 142. P.297-300.
- Marshall Th.H., Akgün A.// J.Biol.Chem. 1971. Vol.246. P.6019-6023.
- Bender M.L., Brubacher L.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.5333-5334.
- Bernhard S.A., Malhotra O.P.// Isr.J.Chem. 1974. Vol.12. P.471-481.
- Smolarek M.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4606-4615.
- Bender M.L., Kezdy F.J., Gunter C.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.3714-3721.
- Cohen S.G., Weinstein S.Y.// Ibid. P.5326-5330.
- Caplow M., Harper C.// Ibid. 1972. Vol.94. P.6508-6512.
- Руми Л.Д., Тиходеева А.Г., Антонов В.К.// Биохимия. 1974. Т.39. С. 899-902.
- Cohen S.G., Torem B., Valdaya V., Ehret A.// J.Biol.Chem. 1976. Vol. 251. P.4722-4728.

- Martinek K., Dorovska V.N., Varfolomeyev S.D., Beresin I.V.// Biochim. et biophys. acta., 1972. Vol.271. P.80-86.
- Cohen S.G., Milovanovic A.// J.Amer.Chem.Soc. 1968. Vol.90. P.3495-3502.
- Cohen S.G., Lo L.W.// J.Biol.Chem. 1970. Vol.245. P.5718-5727.
- Cohen S.G., Newirth Z., Weinstein S.Y.// J.Amer.Chem.Soc. 1966. Vol.88. P.5306-5315.
- Inagami T., York S.S., Patchornik A.// Ibid. 1965. Vol.87. P.126-127.
- Parker L., Wang J.H.// J.Biol.Chem. 1968. Vol.243. P.3729-3734.
- Inagami T., Patchornik A. York S.S.// J.Biochem. 1969. Vol.65. P.809-819.
- Caplow M.// J.Amer.Chem.Soc. 1969. Vol.91. P.3639-3645.
- Fastrez J., Fersht A.R.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.1067-1074.
- Philipp M., Pollack R.M., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1973. Vol.70. P.517-520.
- Petkov D., Christova E., Stoitneva J. // Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol.527. P.131-141.
- Whittaker J.R., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1965. Vol.87. P.2728-2737.
- Brubacher L.J., Bender M.L.// Ibid. 1966. Vol.88. P.5871-5880.
- Fink A.L., Bender M.L.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.5109-5118.
- Клещов А.А., Андреев В.М., Березин И.В.// Биохимия. 1974. Т.39. С.1222-1230.
- Grieco C., Hansch C., Stillo C. et al.// Arch. Biochem. and Biophys. 1979. Vol.194. P.542-551.
- Kozlov L.V., Antonov V.K., Djachenko E.D.// Abstr. VII Meet. FEBS. Varna, 1975. P.110.
- Козлов Л.В., Дьяченко Е.Д., Антонов В.К.// Биоорганическая химия. 1977. Т.3. С.105-110.
- Козлов Л.В.// Биохимия. 1979. Т.44. С.166-171.
- Fersht A.R., Blow D.M., Fastrez J.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.2035-2041.
- Козлов Л.В.// Биохимия. 1980. Т.45. С.1442-1447.
- Козлов Л.В.// Там же. 1979. Т.44. С.172-176.
- Yamamoto T., Izumiya N.// Arch.Biochem. and Biophys. 1966. Vol.114. P.459-464.
- Moffitt M.J., Means G.E.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. Vol.83. P.1415-1421.
- Bergman M., Fruton J.S.// J.Biol.Chem. 1937. Vol.117. P.193-198.
- Bechet J.-J., Dupatz A., Roucoux C.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.2566-2572.
- Yoshimoto M., Hansch C.// J.Org.Chem. 1976. Vol.41. P.2269-2273.
- Polgar L., Fejes J.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.102. P.531-536.
- Hein G.E., McGriff R.B., Niemann C.// J.Amer.Chem.Soc. 1960. Vol.82. P.1830-1831.
- Hein G.E., Niemann C.// Ibid. 1962. Vol.84. P.4487-4494.
- Cohen S.G., Milovanovic A., Schultz R.M., Weinstein S.Y.// J.Biol.Chem. 1969. Vol.244. P.2664-2674.
- Silver M.S., Stoddard M., Sone T., Matta M.S.// J. Amer.Chem. Soc. 1970. Vol.92. P.3151-3160.
- Schwartz H.M., Wu W.-S., Marr P.W., Jones J.B.// Ibid. 1978. Vol.100. P.5199-5203.
- Pattabiraman T.N., Lawson W.B.// J.Biol.Chem. 1972. Vol.247. P.3029-3038.
- Belleau B., Chevalier R.// J.Amer.Chem.Soc. 1968. Vol.90. P.6864-6866.
- Abdulov N.D., Bystrov V.F., Rumsh L.D., Antonov V.K.// Tetrahedron Lett. 1969. Vol.60. P.5287-5290.
- Dugas H.// Canad.J.Biochem. 1969. Vol.47. P.985-987.
- Антонов В.К.// ДАН СССР. 1972. Т.205. С.839-842.
- Казанская Н.Ф., Слободянская Е.М., Цеткин В.И. и др.// Биохимия. 1970. Т.35. С.1147-1152.
- Kowlessur D., Thomas E.W., Topham C.M. et al.// Biochem.J. 1990. Vol.266. P.653-660.
- Sakurai T., Margolin A.L., Russell A.J., Klitbanov A.M.// J.Amer.Chem. Soc. 1988. Vol.110. P.7236-7237.
- Ltn L.-N., Brandts J.F.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.5037-5042.
- Ltn L.-N., Brandts J.F.// Ibid. 1983. Vol.22. P.4480-4485.
- Fisher G., Bang H., Berger G., Schellenberger A.// Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol.791. P.87-97.
- Ltn L.-N., Brandts J.F.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.6533-6538.

- Березин И.В., Варфоломеев С.Д., Мартинек К.// ДАН СССР. 1970. Т.193. С.932-935.
- Николюкская И.И., Петрова В.В., Хмудова М.С. и др.// Успехи биоорганического катализа./ Под ред. И.В.Березина, К.Мартинек. М.: Изд-во МГУ, 1979. С.275-285.
- Айсина Р.Б., Андрианова И.И., Казанская Н.Ф., Лукашева Е.В.// Биохимия. 1979. Т.44. С.2227-2233.
- Antonov V.K.// Proteinases and their inhibitors: Proc. Intern. Symp. (Portoroz, Yugosl.)./ Ed. V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Mlad. Kn.; Oxford: Pergamon Press, 1981. P.141-150.
- Березин И.В., Варфоломеев С.Д.// Биокинетика. М.: Наука, 1979.
- Aaviksoo A., Paris J., Palm V.// Org.React. Tartu. 1971. Vol.8. P. 817-832.
- Косовер Э.// Молекулярная биохимия. М.: Мир, 1964.
- Kunugi S., Hirohara H., Nishimura E., Ise N.// Arch.Biochem. and Biophys. 1978. Vol.189. P.298-308.
- Karasaki Y., Ohno M.// J.Biochem. 1979. Vol.86. P.563-567.
- McKay Th.J., Phelan A.W., Plummer Th.H.// Arch. Biochem. and Biophys. 1974. Vol.197. P.487-492.
- Philipp M., Bender M.L.// Nature. 1973. Vol.244. P.44-46.
- Hardy L.W., Kirsch J.F.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.1275-1282.
- Browner A.C., Kirsch J.F. // Ibid. 1982. Vol.21. P.1302-1307.
- Ogura Y.// Arch.Biochem. and Biophys. 1955. Vol.57. P.288-295.
- Веселова М.Н., Чурай Е.С., Полторак О.М.// Вестн.МГУ. Сер.2, Химия. 1969. Т.10. С.8-12.
- Chong G.L., Davis L.C., Reeck G.R.// Anal.Biochem. 1990. Vol.186. P. 269-272.
- Moriyama K., Oka T.// Arch. Biochem. and Biophys. 1977. Vol.178. P. 188-194.
- Dorer P.E., Lentz K.E., Kahn J.R. et al.// J.Biol.Chem. 1978. Vol. 253. P.3140-3142.
- Nakajima K., Powers J.C., Ashe B.M., Zimmerman M.// Ibid. 1979. Vol. 254. P.4027-4032.
- Ryle A.P., Auffret C.A.// Biochem.J. 1979. Vol.179. P.247-249.
- Martin P., Raymond M.-N., Briceas E., Ribadeau Dumas B.// Biochim. et biophys.acta. 1980. Vol.612. P.410-420.
- McRae B., Nakajima K., Travis J., Powers J.C.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.3973-3978.
- Asenzt P., Menegatti E., Guarnieri M. et al.// Ibid. 1982. Vol.21. P. 2483-2490.
- Robinson N.C., Neurath H., Walsh K.A.// Ibid. 1973. Vol.12. P.420-426.
- Lonsdale-Eccles J.D., Neurath H., Walsh K.A.// Ibid. 1978. Vol.17. P. 2805-2809.
- Lonsdale-Eccles J.D., Kerr H.A., Walsh K.A., Neurath H.// FEBS Lett. 1979. Vol.100. P.157-160.
- Plese P.C., Behnke W.D.// Biochim. et biophys.acta. 1977. Vol.483. P. 172-180.
- Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Антонов В.К.// Биооргани. химия. 1979. Т.5. С.1083-1090.
- Pedersen V.B., Christensen K.A., Foltmann B.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.94. P.573-580.
- Valenzuela P., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. P.3783-3784.
- Hofsteenge J., Braun P.J., Stone S.R.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.2144-2151.
- Серейская А.А., Осадчук Т.В., Корнелюк А.И. и др.// Биохимия. 1989. Т.54. С.542-548.
- Pratt R.E., Ouellette A.J., Dzau V.J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol.80. P.6809-6813.
- Light A., Fonseca P.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.13195-13198.
- Tam L.-T., Engelbrecht S., Talent J.M. et al.// Biochem. and Biophys. Res.Commun. 1985. Vol.133. P.1187-1192.
- Hathaway D.R., Werth D.K., Haerberle J.R.// J.Biol.Chem. 1982. Vol. 257. P.9072-9077.
- Wu H.-L., Shi G.-Y., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1987. Vol. 84. P.8292-8295.
- Wu H.-L., Shi G.-Y., Wohl R.C., Bender M.L.// Ibid. P.8793-8795.
- Vita C., Dalzoppo D., Pontana A.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P. 1798-1806.
- Cohen L.A.// The enzymes, 3rd ed./ Ed. P.D.Boyer. N.Y.: Acad.Press, 1970. Vol.1. P.147-211.

- Stigman D.S., Mooser G.// *Ann.Rev.Biochem.* 1975. Vol.44. P.889-931.
- Glazer A.N., de Lange R.J., Stigman D.S.// *Chemical modification of proteins. Selected method and analytical procedures.* Amsterdam: North-Holland Publ., 1975.
- Inada Y., Yoshimoto T., Matsushima A., Saito Y.// *Trends Biotechnol.* 1986. Vol.4. P.68-73.
- Feeney R.E.// *Intern.J.Peptide and Protein Res.* 1987. Vol.29. P.145-161.
- Мосолов В.В., Валуева Т.В., Соколова Г.И., Антонов В.К.// *ДАН СССР.* 1975. Т.221. С.484-487.
- Puñtwa K., Teuru D.// *Biochim. et biophys.acta.* 1978. Vol.522. P.195-204.
- Polgar L., Sajgo M.// *Ibid.* 1981. Vol.667. P.351-354.
- Philipp M., Isal I.H., Bender M.L.// *Biochemistry.* 1979. Vol.18. P.3769-3773.
- Wu Z.-P., Hilvert D.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1989. Vol.111. P.4513-4514.
- Gorecki M., Wilchek M., Blumberg S.// *Biochim. et biophys.acta.* 1978. Vol.535. P.90-99.
- Cuent L., Riordan J.F.// *Biochemistry.* 1978. Vol.17. P.1834-1841.
- Blumberg S.// *Ibid.* 1979. Vol.18. P.2815-2820.
- Urdea M.S., Legg J.I.// *J.Biol.Chem.* 1979. Vol.254. P.11868-11874.
- Avraham R.B., Shalitin Y.// *FEBS Lett.* 1985. Vol.180. P.239-242.
- Remy M.H., Bourdillon C., Thomas D.// *Biochim. et biophys.acta.* 1985. Vol.829. P.69-75.
- Mozhaev V.V., Štikēnts V.A., Melik-Nubarov N.S. et al.// *Europ.J. Biochem.* 1988. Vol.173. P.147-154.
- Auld D.S., Vallee B.L.// *Biochemistry.* 1970. Vol.9. P.602-609.
- Ajabnoor M.A., Ray L.E., Wagner F.W.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1980. Vol.202. P.540-545.
- Prescott J.M., Wagner F.W., Holmquist B., Vallee B.L.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1983. Vol.114. P.646-652.
- Margolts H.C., Nakagawa Y., Douglas K.T., Kaiser E.T.// *J.Biol.Chem.* 1978. Vol.253. P.7891-7897.
- Beeley J.G.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1977. Vol.76. P.1051-1055.
- Getson M.J.// *FEBS Lett.* 1978. Vol.87. P.111-114.
- Gräf L., Hollos M.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1980. Vol.93. P.1089-1093.
- Loh Y.P., Garner H.// *FEBS Lett.* 1978. Vol.96. P.269-272.
- Hartley B.// *Symp.Soc.Gen.Microbiol.* 1974. Vol.24. P.151-165.
- Betz J.L., Brown P.R., Smyth M.J., Clarke P.H.// *Nature.* 1974. Vol.247. P.261-264.
- Gregoriou M., Brown P.R.// *Europ.J.Biochem.* 1979. Vol.96. P.101-108.
- Zoller M.J., Smith M.// *Meth.Enzymol.* 1983. Vol.100. P.468-475.
- Carter P.// *Biochem.J.* 1986. Vol.237. P.1-7.
- Itakura K., Rosset J.J., Wallace R.B.// *Annu.Rev.Biochem.* 1984. Vol.53. P.323-356.
- Fersht A.R., Shi J.-P., Wilkinson A.J. et al.// *Angew.Chem. (Intern. Ed.).* 1984. Vol.23. P.467-473.
- Smith M.// *Annu.Rev.Genet.* 1985. Vol.19. P.423-462.
- Estell D.A., Graycar T.P., Miller J.V. et al.// *Science.* 1986. Vol.233. P.659-663.
- Carter P., Wells J.A.// *Nature.* 1988. Vol.332. P.564-568.
- Estell D.A., Graycar T.P., Wells J.A.// *J.Biol.Chem.* 1985. Vol.260. P.6518-6521.
- Wells J.A., Powers D.B.// *Ibid.* 1986. Vol.261. P.6564-6570.
- Katz B.A., Kosetkoff A.// *Ibid.* P.15480-15485.
- Wong C.-H., Chen S.-T., Hennen W.J. et al.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1990. Vol.112. P.945-953.
- Matchinson C., Wells J.A.// *Biochemistry.* 1989. Vol.28. P.4807-4815.
- Sternberg M.J.E., Hayes F.R.F., Russell A.J. et al.// *Nature.* 1987. Vol.330. P.86-88.
- Hilvert D., Gardell S.J., Rutter W.J., Kaiser E.T.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1986. Vol.108. P.5298-5304.
- Wells J.A., Powers D.B., Bott R.R. et al.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1987. Vol.84. P.1219-1223.
- Sprang S., Standing T., Fletterick R.J. et al.// *Science.* 1987. Vol.237. P.905-913.
- Wells J.A., Cunningham B.C., Graycar T.P., Estell D.A.// *Proc.Nat. Acad.Sci.USA.* 1987. Vol.84. P.5167-5174.

- Pantoliano M.W., Whitlow M., Wood J.F. et al.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.8311-8317.
- Bryan P., Pantoliano M.W., Quill S.G. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1986. Vol.83. P.3743-3745.
- Craik C.S., Gardell S., Rocznik S. et. al.// Biochemistry. 1985. Vol. 24. P.3373-3380.
- Craik C.S., Rocznik S., Sprang S. et al.// J.Cell.Biochem. 1987. Vol.33. P.199-211.
- Warshei A., Susman F.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1986. Vol.83. P. 3806-3810.
- Graf L., Craik C.S., Patthy A. et al.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.2616-2623.
- McCaman M.T., Cummings D.B.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.15345-15348.
- Yamauchi T., Nagahama M., Hori N., Murakami K.// FEBS Lett. 1988. Vol.230. P.205-208.
- Devault A., Sales V., Nault Ch. et. al.// Ibid. Vol.231. P.54-58.
- Ivanoff L.A., Towatari T., Ray J. et. al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1986. Vol.83. P.5392-5396.
- Mous J., Heimer E.P., le Grice S.F.J.// J.Virol. 1988. Vol.62. P. 1433-1436.
- Dalbadde-McFarland G., Cohen L.W., Riggs A.D. et al.// Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 1982. Vol.79. P.6409-6413.
- Stgal I.S., Harwood B.G., Arentzen R.// Ibid. P.7157-7160.
- Stgal I.S., de Grado W.F., Thomas B.J., Petteway S.R.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.5327-5332.
- Gardell S.J., Craik C.S., Hilvert D. et al.// Nature. 1985. Vol.317. P.551-555.
- Bergmann M., Fraenkel-Conrat H.// J.Biol.Chem. 1937. Vol.119. P.707-712.
- Fruton J.S.// Adv.Enzymol. 1982. Vol.53. P.239-305.
- Moriyama K., Oka T.// Biochem.J. 1977. Vol.163. P.531-542.
- Petkov D.D., Stoincheva Iv.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1984. Vol.118. P.317-323.
- Голомолов М.Ю., Швадас В.К.// Биохимия. 1988. Т.53. С.1174-1180.
- Cheng E., Miranda M.T.M., Tomiyaga M.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1988. Vol.31. P.116-125.
- Шустер Ю., Митин Ю.В., Якубе Г.-Д.// Биоорг.химия. 1989. Т.15. С. 345-347.
- Wayne S.I., Fruton J.S.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1983. Vol.80. P. 3241-3244.
- Reichmann L., Kasche V.// Biochim. et biophys.acta. 1986. Vol.872. P. 269-276.
- Nakanishi K., Matsuno R.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.161. P.533-540.
- Bredam K., Widmer F., Johansen J.T.// Carlsberg Res.Communic. 1980. Vol.45. P.237-247.
- Капитанников Ю.В., Попов А.А., Шимбаревич Е.В. и др.// Биоорг. химия. 1988. Т.14. С.797-802.
- Kapane A., Kasche V.// Biochem. and Biophys.Res.Communic. 1978. Vol.80. P.955-962.
- Konopinska D., Muzalewski F.// Mol. and Cell.Biochem. 1983. Vol.51. P.165-175.
- Nakatsuka T., Sasaki T., Kaiser E.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol. 109. P.3808-3810.
- West J.B., Scholten J., Stolorich N.J. et al.// Ibid. 1988. Vol.110. P.3709-3710.
- Riechmann L., Kasche V.// Biochem. and Biophys.Res.Communic. 1984. Vol. 120. P.686-691.
- Голомолов М.Ю., Борисов И.Л., Швадас В.К.// Биохимия. 1987. Т.52. P. 584-591.
- Homanberg G.A., Mattis J.A., Laskowski M.// Biochemistry. 1978. Vol. 17. P.5220-5227.
- Martinek K., Semenov A.N.// Biochim. et biophys.acta. 1981. Vol.658. P.90-101.
- Bednarski M.D., Chenault H.K., Simon E.S., Whitesides G.R.// J.Amer. Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.1283-1285.
- Reslow M., Adlercreutz P., Mattlason B.// Europ.J. Biochem. 1988. Vol.177. P.313-318.
- Gaertner H., Putzger A.// Ibid. 1989. Vol.181. P.207-213.
- Riva S., Chopineau J., Kleboom A.P.G., Klibanov A.M.// J.Amer.Chem. Soc. 1988. Vol.110. P.584-589.

2160. Kitaguchi H., Klibanov A.M.// Ibid. 1989. Vol.111. P.9272-9273.
2161. Kullmann W.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.8234-8238.
2162. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K.// Bull.Chem.Soc.Jap. 1977. Vol.50. P.2766-2772.
2163. Isowa Y., Ichikawa T., Ohmori M.// Ibid. 1978. Vol.51. P.271-276.
2164. Sealock R.W., Laskowski M.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.3703-3710.
2165. Homandberg G.A., Laskowski M.// Ibid. 1979. Vol.18. P.586-592.
2166. Morihara K., Ueno Y., Sakita K.// Biochem.J. 1986. Vol.240. P.803-810.
2167. Fruton J.S., Johnston R.B., Fried M.// J.Biol.Chem. 1951. Vol.190. P.39-53.
2168. Neumann H., Levin Y., Berger A., Katchalski E.// Biochem.J. 1959. Vol.73. P.33-41.
2169. Takahashi M., Wang T.T., Hofmann T.// Biochem. and Biophys.Res.Commun. 1974. Vol.57. P.39-46.
2170. Dowmont Y.P., Fruton J.S.// J.Biol.Chem. 1952. Vol.197. P.271-283.
2171. Blaw K., Waley S.G.// Biochem.J. 1954. Vol.57. P.538-541.
2172. Yagisawa S., Watanabe S., Takaoka T., Azuma H.// Ibid. 1990. Vol.266. P.771-775.
2173. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. Vol.84. P.95-101.
2174. Fruton J.S., Fujii S., Knappenberger M.H.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1961. Vol.47. P.759-761.
2175. Kitson T.M., Knowles J.R.// Biochem.J. 1971. Vol.122. P.249-256.
2176. Silver M.S., James S.L.T.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.555-560.
2177. Newmark A.K., Knowles J.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1975. Vol.97. P.3557-3559.
2178. Wang T.T., Hofmann T.// Canad.J.Biochem. 1977. Vol.55. P.286-294.
2179. Hanson H., Lasch J.// Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 1967. Vol.348. P.1525-1531.
2180. Nishino T., Kozartch J.W., Strominger J.L.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.2934-2939.
2181. Perkins H.R., Frere J.-M., Ghuyssen J.-M.// FEBS Lett. 1981. Vol.123. P.75-78.
2182. Мальцев Н.И., Гинодман Л.М., Орехович В.Н. и др.// Биохимия. 1966. Т.31. С.983-987.
2183. Sharon N., Gitsaro V., Neumann H.// Arch.Biochem. and Biophys. 1962. Vol.97. P.219-221.
2184. Gitsaro V., Sharon N.// Biochim. et biophys. acta. 1964. Vol.89. P.152-155.
2185. Козаов Л.В., Гинодман Л.М., Орехович В.Н.// ДАН СССР. 1965. Т.161. С.1455-1457.
2186. Козаов Л.В.// Биохимия. 1974. Т.39. С.512-515.
2187. Jackson W.T., Schlamowitz M., Shaw A.// Biochemistry. 1966. Vol.5. P.4105-4110.
2188. Breslow R., Wernic D.L.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1977. Vol.74. P.1303-1307.
2189. Антонов В.К., Гинодман Л.М., Румш Л.Д. и др.// Биооргани.химия. 1980. Т.6. С.436-446.
2190. Sugimoto T., Kalser E.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.7750-7751.
2191. Sugimoto T., Kalser E.T.// Ibid. 1979. Vol.101. P.3946-3951.
2192. Spratt Th.E., Sugimoto T., Kalser E.T.// Ibid. 1983. Vol.105. P.3679-3683.
2193. Nashed N.T., Kalser E.T.// Ibid. 1981. Vol.103. P.3611-3612.
2194. Nashed N.T., Kalser E.T.// Ibid. 1986. Vol.198. P. 2710-2715.
2195. Spratt Th.E., Kalser E.T.// Ibid. 1984. Vol.106. P.6440-6442.
2196. Doherty D.G.// Ibid. 1955. Vol.77. P.4887-4892.
2197. Neurath H., Walsh K.A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1976. Vol.73. P.3825-3832.
2198. Walsh K.A.// Proteases and biological control. Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation/ Ed. E.Reich, D.B.Rifkin, E.Shaw. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1975. Vol.2. P.1-11.
2199. Holzer H.// Annu.Rev.Biochem. 1980. Vol.49. P.63-91.
2200. Gierasch L.M.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.923-930.
2201. Tomita N., Izumoto Y., Horii A. et al.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1989. Vol.158. P.569-575.
2202. Ikemura H., Takagi H., Inouye M.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.7859-7864.
2203. Matheja J., Degens E.T.// Adv.Enzymol. 1971. Vol.34. P.1-39.
2204. Neurath H.// Adv.Protein Chem. 1957. Vol.12. P.319-386.

- Charles M., Rovey M., Guldont A., Deenuelle P.// Biochim. et biophys. acta. 1963. Vol. 69. P. 115-129.
- Jacobsen C.F.// C.R. trav. Lab. Carlsberg. 1947. Vol. 25. P. 325-334.
- Sharma S.K., Hopkine T.R.// J. Biol. Chem. 1978. Vol. 253. P. 3055-3061.
- Parkes C.O., Smillie L.B.// Biochim. et biophys. acta. 1966. Vol. 113. P. 629-631.
- Prahl J.W., Neurath H.// Biochemistry. 1966. Vol. 5. P. 2131-2146.
- Rovey M., Bianchetto J.// Biochim. et biophys. acta. 1972. Vol. 268. P. 212-220.
- Degen S.J.F., Davie E.W.// Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 6165-6177.
- Suttie J.W., Jackson C.M.// Physiol. Rev. 1977. Vol. 57. P. 1-70.
- Ferlund P., Stenflo J., Roepstorff P., Thomsen J.// J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 6125-6133.
- Stenn K.S., Blout E.R.// Biochemistry. 1972. Vol. 11. P. 4502-4515.
- Krishnaswami S., Church W.R., Neehelm M.E., Mann K.G.// J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 3291-3299.
- Geiger R.// Proteinases and their inhibitors: structure, function and applied aspects. Proc. Intern. Symp. (Portorož, Yugosl.) / Ed. V. Turk, Lj. Vitale. Ljubljana: Mlad. Kn.; Oxford: Pergamon Press, 1981. P. 353-376.
- Movat H.Z.// Rev. Physiol., Biochem. and Pharmacol. 1978. Vol. 84. P. 143-202.
- Austen K.F., Fearon D.T.// Adv. Exp. Med. and Biol. B. 1979. Vol. 120. P. 3-17.
- Morgan P.H., Nair J.G.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. Vol. 66. P. 1037-1041.
- Kasahara Y., Oda H., Takahashi K. et al.// J. Biol. Chem. 1985. Vol. 97. P. 365-372.
- Tankersley D.L., Finlayson J.S.// Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 273-279.
- Baba T., Mochikawa Y., Kawakura K., Arat Y.// FEBS Lett. 1989. Vol. 244. P. 132-136.
- Terada I., Kwon S.-T., Miyata Y. et al.// J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 6576-6581.
- Selnesen G., Enghild J.J.// Biochemistry. 1990. Vol. 29. P. 5304-5308.
- Bisenberg M., Johnson L., Moon K.E.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 125. P. 279-285.
- Müller M., Müller H.// J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 11962-11965.
- Ikemura H., Inouye M.// Ibid. 1988. Vol. 263. P. 12959-12963.
- Sten J.L., Franco D., Fujitshige A. et al.// J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 1320-1325.
- Young M., Jo Koroly M.// Biochemistry. 1980. Vol. 19. P. 5316-5321.
- Lo S.-S., Fraser B.A., Liu T.-Y.// J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 11041-11045.
- Sluyterman L.A.// Biochim. et biophys. acta. 1967. Vol. 139. P. 430-438.
- Klein I.B., Kirsch J.F.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1969. Vol. 34. P. 575-581.
- De Martino G.N., Huff C.A., Croall D.E.// J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 12047-12052.
- Herriott R.M.// J. Gen. Physiol. 1938. Vol. 21. P. 501-540.
- Hayano T., Sogawa K., Ichihara Y. et al.// J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 1382-1385.
- Lin X.-L., Wong R.N.S., Tang J.// Ibid. 1989. Vol. 264. P. 4482-4489.
- Auer H.E., Gluck D.M.// Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 2735-2739.
- Gluck D.M., Auer H.E., Ritch D.H. et al.// Ibid. 1986. Vol. 25. P. 1858-1864.
- Gluck D.M., Shalitin Y., Hill C.R.// Ibid. 1989. Vol. 28. P. 2626-2630.
- Hartsuck J.A., Marciniak J., Huang J.S., Tang J.// Adv. Exp. Med. and Biol. 1977. Vol. 95. P. 85-102.
- Scgny C.G., Hartsuck J.A., Tang J.// J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 2635-2639.
- Kay J., Dykes C.W.// Adv. Exp. Med. and Biol. 1977. Vol. 95. P. 103-127.
- Kageyama T., Takahashi K.// J. Biochem. 1983. Vol. 93. P. 743-754.
- Kageyama T., Takahashi K.// Europ. J. Biochem. 1987. Vol. 165. P. 483-490.
- Kozka V., Kellova M., Baudyš H. // Proteinases and their inhibitors: structure, function and applied aspects. Proc. Intern. Symp. (Portorož, Yugosl.) / Ed. V. Turk, Lj. Vitale. Ljubljana: Mlad. Kn.; Oxford: Pergamon Press, 1981. P. 125-140.
- Plechová I., Pohl J., Štěp P., Kostka V.// Aspartic proteinases and their inhibitors/ Ed. V. Kostka. B.; N.Y.: de Gruyter, 1985. P. 301

308.
 Kageyama T., Ichinose M., Miki K. et al.// J.Biochem. 1989. Vol.105. P.15-22.
 Marciniak J.P., Kassell B.// J.Biol.Chem. 1971. Vol.246. P.6560-6565.
 Kumar P.M., Ward P.H., Kassell B.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol. 95. P.211-221.
 Herrlott R.M.// J.Gen.Physiol. 1941. Vol.24. P.325-338.
 Kumar P.M., Kassell B.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.3846-3849.
 Dunn B.M., Deyrup C., Moeschling W.G. et al.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P.7269-7275.
 Петрова Е.Н., Ревина Л.П., Тимохина Е.А. и др.// Биохимия. 1988. Т. 53. С.1389-1396.
 Barrett A.J.// Proteinases in mammalian cells and tissues/ Ed. A.J. Barrett, Amsterdam: North-Holland, 1977. P.209-233.
 Turk V., Putzdar U., Lah T. et al.// Proteinases and their inhibitors: structure, function and applied aspects. Proc. Intern. Symp. (Portorož, Yugosl.)/ Ed. V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Mlad. Kn.; Oxford: Pergamon Press, 1981. P.117-124.
 Putzdar V., Turk V.// FEBS Lett. 1981. Vol.132. P.299-304.
 Samarel A.M., Worobec S.W., Ferguson A.G., Lesch M.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.4702-4705.
 Giesemann V., Hasilik A., Figura K.v.// Ibid. 1985. Vol.260. P.3215-3220.
 Yonezawa S., Takahashi T., Wang X.-j. et al.// Ibid. 1988. Vol.263. P.16504-16511.
 Imai T., Miyazaki H., Hirose S. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol. 80. P.7405-7409.
 Inagami T., Murakami K., Misono K. et al.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol.95. P.225-247.
 Takit Y., Inagami T.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 104. P.133-140.
 Kim S.-J., Hirose S., Miyazaki H. et al.// Ibid. 1985. Vol.126. P. 641-645.
 Fritz L.C., Arfsten A.E., Dzau V.J. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1986. Vol.83. P.4114-4118.
 Leckte B.J., McConnell A., Jordan J.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol.95. P.249-269.
 Higashimori K., Mizuno K., Nakajo S et al.// J.Biol.Chem. 1989. Vol. 264. P.14662-14667.
 Derks F.H.M., Schalekamp M.P.A., Schalekamp M.A.D.H.// Ibid. 1987. Vol.262. P.2472-2477.
 Anson M.L.// J.Gen.Physiol. 1937. Vol.20. P.781-793.
 Keller P.J., Cohen E., Neurath H.// J.Biol.Chem. 1958. Vol.230. P. 905-915.
 Brown J.R., Greenshields R.N., Yamasaki M., Neurath H.// Biochemistry. 1963. Vol.2. P.867-876.
 Freisheim J.H., Walsh K.A., Neurath H.// Ibid. 1967. Vol.6. P.3010-3019.
 Martinez M.C., Nieuwenhuysen P., Clauwaert J., Cuchillo C.M.// Biochem.J. 1983. Vol.215. P.23-27.
 Vendrell J., Cuchillo C.M., Aviles F.X.// J.Biol.Chem. 1990. Vol.265. P.6949-6953.
 Freisheim J.H., Walsh K.A., Neurath H.// Biochemistry. 1967. Vol.6. P.3020-3028.
 Quinto C., Quiroga M., Swain W.F. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1982. Vol.79. P.31-35.
 Chapus C., Kerfelec B., Foglizzo E., Bontcel J.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.166. P.379-385.
 Chang C.-N., Nielsen J.B.K., Izut K. et al.// J.Biol.Chem. 1982. Vol. 257. P.4340-4344.
 Hayashi S., Chang S.-Y., Chang S., Wu H.C.// Ibid. 1984. Vol.259. P. 10448-10454.
 Zwilling R., Pfeleiderer G., Sonnenborn H.H. et al.// J.Comp.Biochem. and Physiol. 1970. Vol.28. P.1275-1281.
 James M.N.G.// Proteolysis and physiological regulation/ Ed. D.W.Ribbons, K.Brew. N.Y.; L.: Acad. Press, 1976. P.125-135.
 Freer S.T., Kraut J., Robertus J.D. et al.// Biochemistry. 1970. Vol. 9. P.1997-2009.
 Wright H.T.// J.Mol.Biol. 1973. Vol.79. P.13-23.
 Wright H.T.// Ibid. P.1-11.

- Morgan P.H., Robinson N.C., Walsh K.A., Neurath H.// Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 1972. Vol.69. P.3312-3316.
- Gertler A., Walsh K.A., Neurath H.// Biochemistry. 1974. Vol.13. P. 1302-1310.
- Chauvet J., Asher R.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1974. Vol.6. P.37-41.
- Bode W., Huber R.// FEBS Lett. 1976. Vol.68. P.231-236.
- Nagendra K., Reddy N., Markus G.// J.Biol.Chem. 1972. Vol.247. P. 1683-1691.
- Carraway K.L., Spoerl P., Koshland D.E.// J.Mol.Biol. 1969. Vol.42. P.133-137.
- Fersht A.R.// FEBS Lett. 1973. Vol.29. P.283-285.
- Hollis D.P., McDonald G., Biltonen R.L.//Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1967. Vol.58. P.758-765.
- Kosman D.J.// J.Mol.Biol. 1972. Vol.67. P.247-264.
- Суровая А.Н., Слободянская Е.М., Козлов Л.В., Антонов В.К.// Молекуляр. биол. 1972. Т.6. С.106-110.
- Bazzoni T.J., Vallee B.L.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.868-875.
- Dixon M.// Biochem.J. 1953. Vol.55. P.161-171.
- Alberty R.A., Massey V.// Biochim. et biophys.acta. 1954. Vol.13. P. 347-353.
- Renard M., Fersht A.R.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.4713-4718.
- Fersht A.R., Renard M.// Ibid. 1974. Vol.13.P.1416-1426.
- Knowels J.R.// Crit.Rev.Biochem. 1976. Vol.4. P.165-205.
- Edsall J.T., Wyman J.// Biophysical chemistry. N.Y.: Acad. Press, 1958. P.510.
- Shiao D.D.F., Lumry R., Rajender S.// Europ.J.Biochem. 1972. Vol.29. P.377-385.
- Fersht A.R., Requena Y.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. P.7079-7087.
- Pettersen G.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.166. P.163-165.
- Bender M.L., Giblin M.J., Whelan D.J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1966. Vol.56. P.833-839.
- Hess G.P., McConn J., Ku E., McConkey G.// Philos.Trans.Royal Soc. London. 1970. Vol.257B. P.89-97.
- Fersht A.R.// J.Mol.Biol. 1972. Vol.64. P.497-509.
- Charg J.-R.// FEBS Lett. 1975. Vol.50. P.339-345.
- Heremans L., Heremans K.// Biochim. et biophys. acta. 1989. Vol.999. P.192-197.
- Murauchi T., Yamazaki M.// Biochemistry. 1970. Vol.9. P.1935-1938.
- Chang W.T., Douglas K.T.// Biochem.J. 1980. Vol.187. P.843-849.
- Bender M.L., Clement G.E., Kezdy F.J., Heck H.d'A.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.3680-3690.
- Johnson Ph.E., Stewart J.A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1972. Vol. 149. P.295-306.
- Antonini E., Ascenzi P.// J.Biol.Chem. 1981. Vol.256. P.12449-12455.
- Ascenzi P., Menagatti E., Guarneri M. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol.789. P.99-103.
- Stewart J.A., Anderson J.K., Tseng J.K., Hallada R.M.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1971. Vol.42. P.1220-1227.
- Kasserra H.P., Laidler K.J.// Canad.J.Chem. 1969.Vol.47. P.4021-4029.
- Stein R.L., Strimpler A.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.6538-6540.
- Hayashi R., Bat Y., Hata T.// J.Biochem. 1975. Vol.77. P.69-79.
- Schack P., Kaarsholm N.C.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P. 631-635.
- Kortt A.A., Liu T.Y.// Ibid. 1973. Vol.12. P.338-345.
- Mole J.E., Horton H.R.// Ibid. P. 816-822.
- Cole P.W., Murakami K., Inagami T.// Ibid. 1971. Vol.10. P.4246-4252.
- Туходеева А.Г., Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К.// ДАН СССР. 1974. Т.214. P.355-358.
- Denburg J.L., Nelson R., Silver M.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1968. Vol.90. P.479-486.
- Hollands T.R., Fruton J.S.// Biochemistry. 1968. Vol.7. P.2045-2053.
- Clement G.E., Cashell G.S.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1972. Vol.47. P.328-332.
- Auld D.S., Vallee B.L.// Biochemistry. 1971. Vol.10. P.2892-2897.
- Bunting J.W., Kabir S.H.// Biochim. et biophys.acta. 1978. Vol.527. P.98-107.
- Feder J., Schuck J.M.// Biotechnol. and Bioeng. 1970. Vol.12. P.313-319.
- Müller-Frohne M., Lasch J., Damerau W., Flittkau S.//Wiss.Ztschr.Univ. Halle. 1979. Vol.28. P.81-97.

- Baker J.O., Prescott J.M.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.5322-5331.
- Bicknell R., Knott-Hunziker V., Waley S.G.// Biochem.J. 1983. Vol. 213. P.61-66.
- Hollands T.R., Voynick I.M., Fruton J.S. // Biochemistry. 1969. Vol. 8. P.575-585.
- Hofmann T., Hodges R.S., James M.N.G.// Ibid. 1984. Vol.23. P.635-643.
- Zeffren E., Kaiser E.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.4204-4208.
- Clement G.E., Snyder S.L., Price H., Cartmell R.// Ibid. 1968. Vol. 90. P.5603-5610.
- Jackson W.T., Schlamowitz M., Shaw A., Trujillo R.// Arch.Biochem. and Biophys. 1969. Vol.131. P.374-385.
- Knowles J.R., Sharp H., Greenwell P.// Biochem.J. 1969. Vol.113. P. 343-351.
- Tahiri Q.S., Rocha T.L., Paiva A.C.M.// Enzymologia. 1969. Vol.37. P. 153-156.
- Ascenzi P., Amiconi G., Bolognesi M. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol.785. P.75-80.
- Ascenzi P., Aducci P., Torroni A. et al.// Ibid. 1987. Vol.912. P. 203-210.
- Halasz P., Polgar L.// Europ.J.Biochem. 1977. Vol.79. P.491-494.
- Broeklenhure K., Malthouse J.P.G.// Biochem.J. 1980. Vol.191. P.707-718.
- Creighton D.J., Gassouroun M.S., Heapes J.M.// FEBS Lett. 1980. Vol. 110. P.319-322.
- Shaked Z., Szajewski R.P., Whitesides G.M.// Biochemistry. 1980. Vol. 19. P.4156-4166.
- Nicholson E.M., Shafer J.A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1980. Vol. 200. P.560-566.
- Johnson F.A., Lewis S.D., Shafer J.A.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.44-48.
- Markley J.L.// Accounts Chem.Res. 1975. Vol.8. P.70-80.
- Robillard G., Shulman R.G.// J.Mol.Biol. 1974. Vol.86. P.519-540.
- Bachovich W.W., Roberts J.D.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P. 8041-8047.
- Sakiyama F., Kawata Y.// J.Biochem. 1983. Vol.94. P.1661-1669.
- Malthouse J.P.G., Primrose W.V., Mackenzie N.E., Scott A.I.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.3478-3487.
- Sust H., Zell T., Tamasheff S.N.// Arch. Biochem. and Biophys. 1959. Vol.85. P.437-443.
- Tamasheff S.N., Rupley J.A.// Ibid. 1972. Vol.150. P.318-323.
- Koeppel R.E., Stroud R.M.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.3450-3458.
- Tamasheff S.N.// The enzymes / Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press, 1970. Vol.2. P.371-443.
- Gorbunoff M.J.// Biochemistry. 1971. Vol.10. P.250-257.
- Cowgill R.W.// Biochim. et biophys.acta. 1965. Vol.94. P.81-88.
- Cruckshank W.H., Kaplan H.// Biochem.J. 1972. Vol.130. P.1125-1131.
- Kitson T.M., Knowles J.R.// FEBS Lett. 1971. Vol.16. P.337-338.
- Migliorini M., Creighton D.J.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol. 156. P. 189-192.
- Willenbrock F., Brocklehurst K.// Biochem.J. 1986. Vol. 238. P.103-107.
- Polgar L., Csoma C.// J.Biol.Chem. 1987. Vol. 262. P.14448-14453.
- Desnuelle P., Gabelotau C.// Arch. Biochem. and Biophys. 1957. Vol. 69. P.475-479.
- Nomoto M., Narahashi Y., Murakami M.// J.Biochem. 1960. Vol. 48. P. 453-463.
- Chao L.-P., Lieneser I.E.// Biochim. et biophys.acta. 1965. Vol.96. P. 508-516.
- Delaage M., Lazdunski M.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. Vol.28. P.390-394.
- Voordouw G., Millo C., Roche R.S.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P. 3716-3724.
- De Jersey J., Lahue R.S., Martin R.B.// Arch. Biochem. and Biophys. 1980. Vol.205. P.536-542.
- Clitte S.G.R., Grant D.A.W.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P.655-658.
- Briedelget L., Frommel C.// FEBS Lett. 1989. Vol.253. P.83-87.
- Martin R.B., Richardson F.S.// Quart.Rev.Biophys. 1979. Vol.12. P. 181-209.
- Золн В.Ф., Коренева Л.Г. // Редкоземельный зонд в химии и биологии. М.: Наука, 1980.

- Snyder A.P., Sudnick D.R., Arkle V.K., Horrocks W.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.3334-3339.
- Birnbaum E.R., Abbott F., Gomez J.E., Darnall D.W.// Arch. Biochem. and Biophys. 1977. Vol.179. P.469-476.
- Bush W.A., Stromer M.H., Goll D.E., Suzuki A.// J.Cell.Biol. 1972. Vol.52. P.367-381.
- Wazman L.// Fed.Proc. 1979. Vol.38. P.479.
- Szpacenko A., Otsuka Y., Goll D.E., Stromer M.N.// Ibid. 1980. Vol.39. P.2044.
- Szpacenko A., Kay J., Goll D.E., Otsuka Y.// Proteinases and their inhibitors: structure, function and applied aspects: Proc. Intern. Symp. (Portorož, Yugosl.)/ Ed. C.V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Mlad. Kn.; Oxford: Pergamon press, 1981. P.151-161.
- Fabiato A., Fabiato F.// Annu.Rev.Physiol. 1979. Vol.41. P.473-484.
- Suzuki K., Tsuji S.// FEBS Lett. 1982. Vol.140. P.16-18.
- Tufty R.M., Kretsinger R.H.// Science. 1975. Vol.187. P.167-169.
- Suzuki K., Tsuji S., Kubota S. et al.// J.Biochem. 1981. Vol.90. P.275-278.
- Suzuki K., Ishiura S.// Ibid. 1983. Vol.93. P.1463-1471.
- Okittani A., Goll D.E., Stromer M.H., Robson R.H.// Fed.Proc. 1976. Vol.35. P.1746.
- Otsuka Y., Goll D.E.// Ibid. 1980. Vol.39. P.2044.
- Pontremoli S., Melloni E., Michetti M. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1988. Vol.85. P.1740-1743.
- Melloni E., Sparatore B., Salamino F. et al.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1982. Vol.107. P.1053-1059.
- Latt S.A., Holmquist B., Vallee B.L.// Ibid. 1969. Vol.37. P.333-339.
- Feder J., Garrett L.R., Wildt B.S.// Biochemistry. 1971. Vol.10. P.4552-4556.
- Shimizu T., Hatano M.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. Vol.104. P.1356-1362.
- Voordouw G., Gaucher G.H., Roche R.S.// Canad.J.Biochem. 1974. Vol.52. P.981-990.
- Matthews B.W., Colman P.M., Jansonius J.N. et al.// Nature. New Biol. 1972. Vol.238. P.41-43.
- Colman P.M., Weaver L.H., Matthews B.W.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1972. Vol.46. P.1999-2005.
- Delange R.J., Smith E.L.// The enzymes. 3rd ed./ Ed. P.Boyer. N.Y.; L.: Acad.press, 1971. Vol.3. P.81-119.
- Lasch J., Kudernatsch W., Hanson H.// Europ.J.Biochem. 1973. Vol.34. P.53-57.
- Krebs H.A.// Biochem.Ztschr. 1930. Vol.220. P.289-298.
- Березин И.В., Вильм Х., Мартинек Л.// ДАН СССР. 1967. Т.175. С.230-233.
- Савин Ю.В., Мартинек К., Березин И.В.// Там же. 1971. Т.197. С.717-720.
- Мартинек К., Вильм Х., Стрельцова З.А., Березин И.В.// Молекуляр.биология. 1969. Т.3. С.554-565.
- Dorer F.E., Kahn J.R., Lentz K.E. et al.// Circ.Res. 1974. Vol.34. P.824-827.
- Söderling E.// Arch.Biochem. and Biophys. 1982. Vol.216. P.105-115.
- McDonald J.K., Reilly Th.J., Zeitman B.B., Ellis S.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. Vol.24. P.771-775.
- Shapiro R., Holmquist B., Riordan J.F.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.3850-3857.
- Oshima G., Gecse A., Erdős E.G.// Biochim. et biophys. acta. 1974. Vol.350. P.26-37.
- Shapiro R., Riordan J.F.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.5315-5321.
- Watabe S., Tarada A., Ikeda T. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. Vol.89. P.1161-1167.
- Chin J.F., Boeker E.A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1979. Vol.196. P.493-500.
- Svenneby G.// J.Neurochem. 1971. Vol.18. P.2201-2208.
- Hippel P.H.v., Schleich T.// Accounts Chem. Res. 1969. Vol.2. P.251-257.
- Martin R.B., Niemann C.// J.Amer.Chem.Soc. 1957. Vol.79. P.4814.
- Martin R.B., Niemann C.// Ibid. 1958. Vol.80. P.1481-1486.
- Miles J.L., Robinson D.A., Canady W.Y.// J.Biol.Chem. 1963. Vol.238. P.2932-2937.
- Valenzuela P., Bender M.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1969. Vol.63. P.1214-1221.

- Kahana L., Shalitin Y.// *Isr.J.Chem.* 1974. Vol.12. P.573-589.
- Royer G., Cuppett C.C., Williams E. et al.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1969. Vol.134. P.253-255.
- Zolton R.P., Mertz E.T.// *Canad.J.Biochem.* 1971. Vol.49. P.529-537.
- Williams A.C., Auld D.S.// *Biochemistry.* 1986. Vol.25. P.94-100.
- Bicknell R., Schäffer A., Bertini I. et al.// *Biochemistry.* 1988. Vol.27. P.1050-1057.
- Hirose J., Ando S., Kikami Y.// *Biochemistry.* 1987. Vol.26. P.6561-6565.
- Дюзу П. Кробиохимия. М.: Мир, 1980.
- Harned H.S., Owen B.B.// *The physical chemistry of electrolytic solutions.* N.Y.: Reinhold, 1958. P.755-756.
- Inagami T., Sturtevant J.M.// *Biochim. et biophys.acta.* 1960. Vol.38. P.64-79.
- Laidler K.J. *The chemical kinetics of enzyme action.* L.: Oxford Univ. press, 1958.
- Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966.
- Castañeda-Agullo M., Del Castillo L.M.// *J.Gen.Physiol.* 1959. Vol.42. P.617-623.
- Mares-Guia M., Figueroa A.F.S.// *Biochemistry.* 1972. Vol.11. P.2091-2098.
- Fink A.L.// *Ibid.* 1974. Vol.13. P.277-280.
- Barbas C.F., Matos J.R., West J.B., Wong C.-H.// *J.Amer. Chem.Soc.* 1988. Vol.110. P.5162-5166.
- Clement G.E., Bender M.L.// *Biochemistry.* 1963. Vol.2. P.836-843.
- Maurel P.// *J.Biol.Chem.* 1978. Vol.253. P.1677-1683.
- Zaks A., Klitbanov A.M.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1986. Vol.108. P.2767-2768.
- Zaks A., Klitbanov A.M.// *J.Biol.Chem.* 1988. Vol.263. P.3194-3201.
- Zaks A., Klitbanov A.M.// *Ibid.* P.8017-8021.
- Russell A.J., Klitbanov A.M.// *Ibid.* P.11624-11626.
- Schowen R.L.// *Isotope effects on enzyme-catalyzed reactions.* Ed. W. W.Cleland, M.H.O'Leary, D.B.Northrop. Baltimore: Univ. Park press, 1977. P.64-99.
- Mason R., Ghiron C.A.// *Biochim. et biophys. acta.* 1961. Vol.51. P.377-378.
- Kresge A.J.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1973. Vol.95. P.3065-3067.
- Pollock E., Hogg J.L., Schowen R.L.// *Ibid.* P.968-969.
- Quinn D.M., Elrod J.P., Ardis R. et al.// *Ibid.* 1980. Vol.102. P.5358-5365.
- Elrod J.P., Hogg J.L., Quinn D.M. et al.// *Ibid.* P.3917-3922.
- Northrop D.B.// *Ibid.* 1981. Vol.103. P.1208-1212.
- Хоштария Д.Э.// *Биооргани.химия.* 1978. Т.4. С.1673-1677.
- Clement G.E., Snyder S.L.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1966. Vol.88. P.5338-5339.
- Hollands R., Fruton J.S.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1969. Vol.62. P.1116-1120.
- Kaiser B.L., Kaiser E.T.// *Ibid.* Vol.64. P.36-41.
- Quinn D.M., Venkatasubban K.S., Kise M., Schowen R.L.// *J.Amer.Chem. Soc.* 1980. Vol.102. P.5365-5369.
- Хоштария Д.Э., Тополев В.В., Кришталюк Л.И.// *Биооргани.химия.* 1978. Т.4. С.1341-1351.
- Lumry R.// *The enzymes* Ed. P.Boyer, H.Lardy, K.Myrback. N.Y.: Acad. press, 1959. Vol.1.
- Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977.
- Laidler K.J., Bunting P.S.// *The chemical kinetics of enzyme action.* 2nd ed. Oxford: Oxford Univ.press, 1973. P.220.
- Adams P.A., Swart E.R.// *Biochem.J.* 1977. Vol.161. P.83-92.
- Dorowska-Taran V., Momtcheva R., Gulubova N., Martinek K.// *Biochim. et biophys.acta.* 1982. Vol.702. P.37-53.
- Rajender S., Lumry R., Han M.// *J.Phys.Chem.* 1971. Vol.75. P.1375-1386.
- Slighton J.L., Bolen D.W.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1980. Vol.102. P.6318-6324.
- Kunugi S., Hirohara H., Ise N.// *Ibid.* 1979. Vol.101. P.3640-3646.
- De Souza Otero A., Rogana E., Mares-Guia M.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1980. Vol.204. P.109-116.
- Balnes N.J., Baird J.B., Elmore D.T.// *Biochem.J.* 1964. Vol.90. P.470-476.
- Marshall Th.H., Chen V.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1973. Vol.95. P.5400-5405.
- Fukuda M., Kunugi S.// *Europ.J.Biochem.* 1984. Vol.142. P.565-570.
- Rajender S., Han M., Lumry R.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1970. Vol. 92.

- P.1378-1385.
 Baggott J.E., Klapper M.H.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.1473-1481.
 Londerborough J.// Europ.J.Biochem. 1980. Vol.105. P.211-215.
 Wang C.-L.A., Calvo K.S., Klapper M.H.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.1401-1408.
 Козлов Л.В., Мещерякова Е.А., Завада Л.Л. и др.// Биохимия. 1979. Т. 44. С.338-349.
 Sturtevant J.M.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1977. Vol.74. P.2236-2240.
 Shiao D.D.F., Sturtevant J.M.// Biochemistry. 1969. Vol.8. P.4910-4918.
 Shiao D.D.F.// Ibid. 1970. Vol.9. P.1083-1090.
 Schultz R.M., Konovess-Panayotatos A., Peters J.R. // Ibid. 1977. Vol.16. P.2194-2202.
 Mares-Guia M., Figueiredo A.F.S.// Ibid. 1970. Vol.9. P.3223-3227.
 Liu C.Y., Kaplan K.L., Markowitz A.H., Nossel H.L. // J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.7627-7630.
 Kunugi S., Fukuda M., Ise N.// Biochim. et biophys. acta. 1982. Vol. 704. P.107-113.
 Makimoto S., Taniguchi Y.// Ibid. 1987. Vol.914. P.304-307.
 Лизтеништейн Г.И., Сутороков Б.И.// ЖФХ. 1964. Т.38. P.747-751.
 Лизтеништейн Г.И.// Биофизика. 1966. Т.11. С.24-28.
 Lumry R., Rajender S.// Biochemistry. 1970. Vol.9. P.1125-1227.
 Northrop J.N.// Ergeb.Enzymforsch. 1932. Vol.1. P.302-316.
 Антонов В.К., Воротищева Т.И., Коган Г.А.//Молекуляр.биология. 1970. Т.4. С.240-245.
 Брандтс Д. Ф. //Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. С.174-254.
 Sumner J.B., Somers G.F. Chemistry and methods of enzymology. 3rd ed. N.Y.: Acad.press, 1953.
 Symposium on Growth of Microorganisma at Extrems of Temperature// J. Appl.Bacteriol. 1968. Vol.31. P.1-120.
 Proceedings of International Symposium on Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms, Zürich (1975). Basel: Birkhäuser Verl., 1976.
 Билай Т.И. Термостабильные ферменты грибов. Киев: Наук.думка, 1979.
 Schreier E., Pittkau S., Höhne W.E.// Intern. J.Peptide and Protein Res. 1984. Vol.23. P.134-141.
 Thomas D.J., Richards A.D., Jupp R.A. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol. 243. P.145-148.
 McCorn J.D., Tsuru D., Yasunobu K.T.// J.Biol.Chem. 1964. Vol.239. P. 3706-3715.
 Whitaker D.R.// Meth.Enzymol. 1970. Vol.19. P.599-613.
 Topfner H., Retsche K.// Folia haematol. 1970. Vol.101. P.91-98.
 Kundu A.K., Manna S.// Appl.Microbiol. 1975. Vol.30. P.507-513.
 Hubert F.M., Barnwell P.A., Baltz R.H.// Mycopathol. et mycol.appl. 1971. Vol.44. P.149-157.
 Билай Т.И., Затарченко В.А., Жернова И.И.// Метаболиты почвенных грибов. Киев: Наук.думка, 1971. С.177-182.
 Schmitt G.A., Babel F.I.// J.Bacteriol. 1968. Vol.95. P.1407-1414.
 Cravert R., Manachini P.L., Aragoezzini F. // Mycopathol. et mycol. appl. 1974. Vol.54. P.193-204.
 Hashimoto H., Iwasa T., Yokotsuka T.// Appl.Microbiol. 1973. Vol.25. P.578-583.
 Караваева Н.И., Мутильдинова Г.Н.// Прикладная биохимия и микробиология. 1975. Т.11. С.704-710.
 Perutz M.F.// Science. 1978. Vol.201. P.1187-1191.
 Argos P., Rossmann M.G., Grau U.M. et al.// Biochemistry. 1979. Vol. 18. P.5698-5703.
 Dill K.A., Alonso D.O.V., Hutchinson K.// Ibid. 1989. Vol.28. P.5439-5449.
 Menéndez-Artas L., Argos P.// J.Mol.Biol. 1989. Vol.206. P.397-406.
 Мелик-Нубаров Н.С., Шикис В.А., Слепнев В.И. и др.// Молекуляр.биология. 1990. Т.24. С.346-357.
 Imanaka T., Shibasaki M., Takagi M.// Nature. 1986. Vol.324. P.695-697.
 Иммуобилизованные ферменты / Под ред. И.В.Березина, К.Мартинека, В.К. Антонова. М.: Изд-во МГУ, 1976. Т.2. С.7-17.
 Мартинек К., Клибанов А.М., Чернышева А.В., Березин И.В.// ДАН СССР. 1975. Т.223. С.233-236.
 Fink A.L.// J.Theor.Biol. 1976. Vol.61. P.419-445.

- Fink A.L.// Accounts Chem.Res. 1977. Vol.10. P.233-239.
 Douzou P.// Adv.Enzymol. 1977. Vol.45. P.157-272.
 Bielky B.H.J., Freed S.// Biochim. et biophys.acta. 1964. Vol.89. P. 314-323.
 Galdes A., Auld D.S., Vallee B.L.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P. 1888-1893.
 Geoghegan K.F., Galdes A., Martinelli R.A. et al.// Ibid. P.2255-2262.
 Cartwright S.J., Waley S.G.// Ibid. 1987. Vol.26. P.5329- 5337.
 Douzou P., Balny C.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1977. Vol.74. P.2297-2300.
 Fink A.L.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.1736-1742.
 Александров С.Л., Антонов В.К.// Биохимия. 1974. Т.39. С.96-101.
 Fink A.L.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.1580-1586.
 Fink A.L., Feldman R., Zehnder J.// Biochem.J. 1979. Vol.181. P.733-736.
 Douzou P., Reh E., Balny C.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1979. Vol.76. P. 681-684.
 Malthouse J.P.G., Scott A.I.// Biochem.J. 1983. Vol.215. P.555-563.
 Compton P., Fink A.L.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.2989-2994.
 Compton P.D., Coll R.J., Fink A.L.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P. 1248-1252.
 Fink A.L., Groyn C.// Biochemistry. 1979. Vol. 13, N 6. P. 1190-1194.
 Angelides K.J., Fink A.L.// Ibid. 1978. Vol.17. P.2659-2668.
 Angelides K.J., Fink A.L.// Ibid. 1979. Vol.18. P.2355-2363.
 Makinen M.W., Yamamura K., Kaiser E.T.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1976. Vol.73. P.3882-3886.
 Sander M.E., Witzel H.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1985. Vol. 132. P.681-687.
 Dunn B.M., Fink A.L.// Biochemistry.1984. Vol.23. P.5241-5247.
 Hofmann Th., Fink A.L.// Ibid. P.5247-5256.
 Lin S.H., Wart H.E.v.// Ibid. 1982. Vol.21. P.5528-5533.
 Wart H.E.v., Lin S.H.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1983. Vol.80. P.7506-7509.
 Lin W.-Y., Lin S.H., Morris R.J., Wart H.E.v.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.5068-5074.
 Viriden R., Tan A.K., Fink A.L.// Ibid. 1990. Vol.29. P.145-153.
 Compton P., Fink A.L.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1980. Vol. 93. P.427-431.
 Douzou P., Hoa G.H.B., Petsko G.A.// J.Mol.Biol. 1974. Vol.96. P.367-380.
 Petsko G.A.// Ibid. 1975. Vol.96. P.381-392.
 Douzou P.// Adv.Protein Chem. 1984. Vol.36. P.245-361.
 Mackenzie N.E., Malthouse J.P.G., Scott A.I.// Biochem.J. 1984. Vol. 219. P.437-444.
 Мартинек К., Левашев А.В., Клячко Н.Л., Березин И.В. // ДАН СССР. 1977. Т.236. С.920-923.
 Peng Q., Lutet P.L.// Europ.J.Biochem. 1990. Vol.188. P.471-480.
 Walde P., Peng Q., Podnauis N.W. et al.// Ibid. 1988. Vol.173. P.401-409.
 Березин И.В., Мартинек К.// Молекуляр.биология. 1971. Т.5. С.347-350.
 Вржеч П.В.// Биохимия. 1988. Т.53. С.1704-1711.
 Straus O.H., Goldstein A.// J.Gen.Physiol. 1943. Vol.26. P.559-568.
 Sculley M.J., Morrison J.P. // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 874. P.44-53.
 Крутянко В.И.// Метод K_m^V -системы координат в ферментативной кинетике. Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1987.
 Березин И.В., Мартинек К.// Теорет. и эксперим. химия. 1967. Т.3. С. 458-462.
 Shaw E.// Physiol.Rev. 1970. Vol.50. P.243-296.
 Kitz R., Wilson I.B.// J.Biol.Chem. 1962. Vol.237. P.3245-3249.
 Leytus S.P., Toledo D.L., Mangel W.F.// Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol.788. P.74-86.
 Gray P.J., Duggleby R.G.// Biochem.J. 1989. Vol.257. P.419-424.
 Ray W.J., Koshland D.E.// J.Biol.Chem. 1961. Vol.236. P.1973-1979.
 Tsou Chen-Lu// Sci.sin. 1962. Vol.11. P.1535-1558.
 Horike K., Tojo H., Yamano T., Nozaki M.// J.Biochem. 1984. Vol.95. P.605-609.
 Wallace R.A., Kurtz A.N., Nlemann C.// Biochemistry. 1963. Vol.2. P. 824-836.
 Мартинек К., Левашев А.В., Березин И.В.// Молекуляр. биология. 1970.

- T.4. C.517-528.
 Мартинек К., Левашев А.В., Березин И.В.// Там же. С.339-347.
 Hynes A.J., Robinson D.A., Canady W.J.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.134-138.
 Berestn I.V., Levashov A.V., Martinek K.// FEBS Lett. 1970. Vol.7. P.20-22.
 Berestn I.V., Levashov A.V., Martinek K.// Europ. J.Biochem. 1970. Vol.16. P.472-476.
 Geratz J.D., Stevens F.M., Polakoski K.L. et al.// Arch. Biochem. and Biophys. 1979. Vol.197. P.551-559.
 Nakayama T., Okutome T., Matsui R. et al.// Chem. and Pharm. Bull. 1984. Vol.32. P.3968-3980.
 Glaser A.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1965. Vol.54. P.171-176.
 Bernhard S.A., Lee B.F., Tashjian Z.H.// J.Mol.Biol. 1966. Vol.18. P.405-420.
 Glaser A.N.// J.Biol.Chem. 1967. Vol.242. P.3326-3331.
 Антонов В.К., Дьяков В.А.// Биооргани.химия. 1975. Т.1. С.1324-1331.
 Ворфоломеев С.Д., Мартинек К., Березин И.В.// Молекуляр. биология. 1972. Т.6. С.148-152.
 Ворфоломеев С.Д., Мартинек К., Березин И.В.// Там же. 1973. Т.7. С.115-123.
 Glaser A.N.// J.Biol.Chem. 1967. Vol.242. P.4528-4533.
 Kalos J., Avatts K.// Biochemistry. 1966. Vol.5. P.1979-1983.
 Саломаш В.А., Ануфриева Е.В., Волкешштейн И.В.// Молекуляр.биология. 1971. Т.5. С.711-717.
 Tang J.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.3810-3815.
 Hill R.L., Smith E.L.// Ibid. 1957. Vol.224. P.209-223.
 Feder J., Garrett L.R., Kochavi D.// Biochim. et biophys.acta. 1971. Vol.235. P.370-377.
 Chao J., Tanaka S., Margolius H.S.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.6461-6465.
 Seol J.H., Park S.C., Ha D.B. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol.247. P.197-200.
 Antonov V.K.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol.95. P.179-198.
 Bender M.L., Wedler F.C.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.3052-3054.
 McConn J., Ku E., Odele C. et al.// Science. 1968. Vol.161. P.274-276.
 Valenzuela P., Bender M.L.// Biochemistry. 1970. Vol.9. P.2440-2446.
 Martin C.J., Frazier A.R.// J.Biol.Chem. 1963. Vol.238. P.3268-3273.
 Friedberg F., Long J.E., Brecher A.S.// Proc.Soc. Exp. Biol. and Med. 1969. Vol.130. P.1046-1047.
 Nichol L.W., Jackson W.J.H., Winzor D.J.// Biochemistry. 1972. Vol.11. P.585-591.
 Simpson R.T., Riordan J.F., Vallee B.L.// Ibid. 1963. Vol.2. P.616-622.
 McClure W.O., Neurath H., Walsh K.A.// Ibid. 1964. Vol.3. P.1897-1901.
 Bunting J.W., Chu S.S.-T.// Biochim. et biophys.acta. 1978. Vol.524. P.142-155.
 Bender M.L., Whittaker J.R., Menger F.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1965. Vol.53. P.711-716.
 Cleland W.W.// Biochim. et biophys.acta. 1963. Vol.67. P.104-137.
 Kitson T.M., Knowles J.R.// Biochem.J. 1971. Vol.122. P.241-247.
 Козлов Л.В., Забада Л.Л.// Молекуляр.биология. 1979. Т.9. С.735-741.
 Silver M.S., Stoddard M.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.614-620.
 Byers L.D., Wolfenden R.// Ibid. 1973. Vol.12. P.2070-2078.
 McKay J.T., Plummer T.H.// Ibid. 1978. Vol.17. P.401-405.
 Plummer T.H., Ryan T.J.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1981. Vol.98. P.448-454.
 Tamura Y., Hirado M., Okamura K. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol.484. P.417-422.
 Pfuetzner R.A., Chan W.W.-C.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.4056-4058.
 DiGregorio M.D., Pickering D.S., Chan W.W.-C.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.3613-3617.
 Inouye K., Fruton J.S.// Ibid. 1967. Vol.6. P.1765-1777.
 Feder J., Brougham L.R., Wildt B.S.// Ibid. 1974. Vol.13. P.1186-1189.
 Дьяченко Е.Д., Волокова Л.И., Козлов Л.В., Антонов В.К.// Молекуляр. биология. 1974. Т.8. С.879-885.

- Burton J., Poulsen K., Haber E.// *Biochemistry*. 1975. Vol.14. P.3892-3898.
- Клосов А.А., Цеткин В.И.// *Биоорганическая химия*. 1977. Т.3. С.1523-1538.
- Llorens C., Gacel G., Swerts J.-P. et al.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1980. Vol.96. P.1710-1716.
- Lin T.-Y., Williams H.R.// *J. Biol. Chem.* 1979. Vol.254. P.11875-11883.
- Okada Y., Tsuda Y., Teno N. et al.// *Chem. and Pharm. Bull.* 1985. Vol.33. P.5301-5309.
- Murphy J., Rowlett R., Smith S.B., Hoeflerlin J.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1980. Vol.202. P.405-413.
- Inouye K., Fruton J.S.// *Biochemistry*. 1968. Vol.7. P.1611-1615.
- Leestienne P., Dimicoll J.L., Wermuth C.G., Bleth J.G.// *Biochim. et biophys. acta*. 1981. Vol.658. P.413-416.
- Dunlap R.P., Stone P.J., Abeles R.H.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. Vol.145. P.509-513.
- Imperiali B., Abeles R.H.// *Biochemistry*. 1987. Vol.26. P.4474-4477.
- Stein R.L., Strimpler A.M., Edwards P.D. et al.// *Ibid.* P.2682-2689.
- Sham H.L., Stein H., Rempel C.A. et al.// *FEBS Lett.* 1987. Vol.220. P.299-301.
- Liang T.-C., Abeles R.H.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1987. Vol.252. P.626-634.
- Plattner J.J., Greer J., Fung A.K.L. et al.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol.139. P.982-990.
- Cooper J., Foulding S., Hemmings A. et al.// *Europ. J. Biochem.* 1987. Vol.169. P.215-221.
- Dann J.G., Stammers D.K., Harris C.J. et al.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol.134. P.71-77.
- Epps D.E., Schostarez H., Argoudelis C.V. et al.// *Anal. Biochem.* 1989. Vol.181. P.172-181.
- Natarajan S., Gordon E.M., Sabo E.F. et al.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol.124. P.141-147.
- Grobstein D., Golt U.B., Galardy R.E.// *Biochemistry*. 1985. Vol.24. P.7612-7617.
- Wallace D.A., Bates S.R.E., Walker B. et al.// *Biochem. J.* 1986. Vol.239. P.797-799.
- Bartlett P.A., Kezer W.B.// *J. Amer. Chem. Soc.* 1984. Vol.106. P.4282-4283.
- Nishino N., Powers J.C.// *Biochemistry*. 1979. Vol.18. P.4340-4347.
- Holmquist B., Vallee B.L.// *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol.76. P.6216-6220.
- Ondetti M.A., Condon M.E., Reid J. et al.// *Biochemistry*. 1979. Vol.18. P.1427-1430.
- Galardy R.E.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1980. Vol.97. P.94-99.
- Jacobsen N.E., Bartlett P.A.// *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. Vol.103. P.654-657.
- Weller H.N., Gordon E.M., Rom M.B., Pluščec J.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol.125. P.82-89.
- Ocain T.D., Rich D.H.// *Ibid.* 1987. Vol.145. P.1038-1042.
- Bartlett P.A., Marlowe Ch.K.// *Science*. 1987. Vol.235. P.569-571.
- Benchetrit T., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. Vol.147. P.1034-1040.
- Christianson D.W., Lipscomb W.N.// *J. Amer. Chem. Soc.* 1988. Vol.110. P.5560-5565.
- Roderick S.L., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P., Matthews B.W.// *Biochemistry*. 1989. Vol.28. P.1493-1497.
- Lejczak B., Kafarski P., Zygmunt J.// *Ibid.* P.3549-3555.
- King G.F., Crossley M.J., Kuchel P.W.// *Europ. J. Biochem.* 1989. Vol.180. P.377-384.
- Okuda M., Arakawa K.// *J. Biochem.* 1985. Vol.98. P.621-628.
- Vallee B.L., Rjordan J.P., Johansen J.T., Livingston D.M.// *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1971. Vol.36. P.517-531.
- Nesheim M.E., Prendergast F.G., Mann K.G.// *Biochemistry*. 1979. Vol.18. P.996-1003.
- Lobb R.R., Auld D.S.// *Ibid.* 1980. Vol.19. P.5297-5302.
- Baker B.R.// *Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors. The organic chemistry of the enzymic active site*. N.Y.: Wiley, 1967.
- Shaw E., Green G.D.J.// *Meth. Enzymol.* 1981. Vol.80. Pt. C. P.820-826.
- Kattner C., Shaw E.// *Ibid.* P.826-842.
- Hartley B.S., Kilby B.A.// *Nature*. 1950. Vol.166. P.784-786.

- Boone B.J., Becker E.L., Canham D.H.// Biochim. et biophys. acta. 1964. Vol.85. P.441-445.
- Mounter L.A., Shipley B.A., Mounter M.-E.// J.Biol.Chem. 1963. Vol. 238. P.1979-1983.
- Kováč I.M., Larson M., Schowen R.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol. 108. P.5490-5495.
- Gorenstein D.G., Shah D., Chen R., Kalltick D.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.2050-2058.
- Stikk P.F., Aaviksaar A.A., Godovtsov N.N. et al.// Org.React.(Tartu). 1970. Vol.7. P.986-995.
- Silipo C., Hansch C., Grieco C., Vittoria A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1979. Vol.194. P.552-557.
- Cohen W., Erlanger B.F.// J.Amer.Chem.Soc. 1960. Vol.82. P.3928-3934.
- Cohen W., Lache M., Erlanger B.F.// Biochemistry. 1962. Vol.1. P.686-693.
- Fahrney D.E., Gold A.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1963. Vol.85. P.997-1000.
- Gold A.M.// Biochemistry. 1965. Vol.4. P.897-901.
- Laura R., Robison D.J., Bing D.H.// Ibid. 1980. Vol.19. P.4859-4864.
- Erlanger B.F., Cooper A.G., Cohen W.// Ibid. 1966. Vol.5. P.190-196.
- Shaw E.// The enzymes. / Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press, 1970. Vol.1. P.91-146.
- Yoshimoto T., Orlowski R.C., Walter R.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.2942-2948.
- Powers J.C., Gupton B.F., Harley A.D. et al.// Biochim. et Biophys. acta. 1977. Vol.485. P.156-166.
- Collen D., Lijnen H.R., de Cock F. et al.// Ibid. 1980. Vol.615. P. 158-166.
- Renaud A., Dimicoli J.L., Lestienne P., Bleth J.// J.Amer.Chem.Soc. 1978. Vol.100. P.1005-1007.
- Kettner Ch., Shaw E.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4778-4784.
- Pelton J.T., Johnston R.B., Balk J.L. et al.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1980. Vol.97. P.1391-1398.
- Johnston L.A., Moon K.E., Eisenberg M.// Biochim. et biophys. acta. 1988. Vol.953. P.269-279.
- Ong E.B., Shaw E., Schoellmann G.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P. 694-698.
- Stevenson K.J., Smillie L.B.// J.Mol.Biol. 1965. Vol.12. P.937-941.
- Blair T.T., Marini M.A., Martin C.J.// FEBS Lett. 1972. Vol.20. P.41-43.
- Penny G.S., Dyckes D.F.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.2888-2894.
- Shaw E., Rusicka J.// Arch. Biochem. and Biophys. 1971. Vol.145. P. 484-489.
- McMurray J.S., Dyckes D.F.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.2298-2301.
- Pinucane M.D., Hudson E.A., Malthouse J.P.G.// Biochem.J. 1989. Vol. 258. P.853-859.
- Stein M.J., Litner I.E.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1967. Vol. 26. P.376-379.
- Raenick D.// Anal.Biochem. 1985. Vol.149. P.461-465.
- Rauber P., Anglikar H., Walker B., Shaw E.// Biochem.J. 1986. Vol. 239. P.633-640.
- Smith R.A., Coop L.J., Donnelly S.L. et al.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.6568-6573.
- Lawson W.B., Rao G.J.S.// Ibid. 1980. Vol.19. P.2133-2139.
- Groutas W.C., Brubaker M.J., Zandler M.E. et al.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1985. Vol.128. P.90-93.
- Segal D., Shalitin Y., Wingert H. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol.247. P.217-220.
- Schenkein D.P., Pratt R.F.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.45-48.
- Leary R., Larsen D., Watanabe H., Shaw E.// Biochemistry. 1977. Vol. 16. P.5857-5861.
- Fujiwara K., Matsumoto E., Kitagawa T., Tsuru D.// Biochim. et biophys.acta. 1982. Vol.702. P.149-154.
- Zumbrunn A., Stone S., Shaw E.// Biochem.J. 1988. Vol.250. P.621-623.
- Brockenhurst K., Malthouse J.P.G.// Ibid. 1978. Vol.175. P.761-764.
- Watanabe H., Green G.D., Shaw E.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1979. Vol.89. P.1354-1360.
- Kirshke H., Wikstrom P., Shaw E.// FEBS Lett. 1988. Vol.228. P.128-130.
- Husain S.S., Lowe G.// Biochem.J. 1968. Vol.110. P.53-57.
- Smith R.A., Copp L.J., Coles P.J. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1988. Vol.110. P.4429-4431.

- Smith R.A., Coles P.J., Spencer R.W. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. Vol.155. P.1201-1206.
- Shaw E.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.2768-2772.
- Rajagopalan T.G., Stein W.H., Moore S.// Ibid. 1966. Vol.241. P.4295-4297.
- Ong E.B., Perlmann G.E.// Nature. 1967. Vol.215. P.1492-1494.
- Stepanov V.M., Lobareva L.S., Mal'tsev N.I.// Biochim. et Biophys. acta. 1968. Vol.151. P.719-721.
- Husain S.S., Ferguson J.B., Fruton J.S.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA.1971. Vol.68. P.2765-2768.
- Trost B.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.138-142.
- Nakayama S.-J., Nagashtma Y., Hoshino M. et al.// J.Biochem. 1983. Vol.93. P.1297-1304.
- Tang J.// J.Biol.Chem. 1971. Vol.246. P.4510-4517.
- Ross W.C.J.// J.Chem.Soc. 1960. P.2257-2261.
- Chen K.C.S., Tang J.// J.Biol.Chem. 1972. Vol.247. P.2566-2574.
- Raenick D., Powers J.C.// Biochemistry.1978. Vol.17, N 21.P.4363-4369
- Holmes M.A., Tronrud D.E., Matthews B.W.// Biochemistry. 1983. Vol. 22. P.236-240.
- Fittkau S., Förster U., Pascual C., Schunck W.-H.// Europ.J.Biochem. 1974. Vol.44. P.523-528.
- Valenty V.B., Wos J.D., Lobo A.P., Lawson W.B.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. Vol.88. P.1375-1381.
- Zimmerman M., Morman H., Mulvey D. et al.// J.Biol.Chem. 1980. Vol. 255. P.9848-9851.
- Hedstrom L., Moorman A.R., Dobbs J., Abeles R.H.// Biochemistry.1984. Vol.23. P.1753-1759.
- Ringe D., Mottonen J.H., Gelb M.H., Abeles R.H.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.5633-5638.
- Kam C.-M., Fujikawa K., Powers J.C.// Ibid. 1988. Vol.27. P.2547-2557.
- Baek D.-J., Reed P.E., Daniels S.B., Katzenellenbogen J.A.// Ibid. 1990. Vol.29. P.4305-4311.
- Groutas W.C., Badger R.C., Ocaln T.D. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. Vol.95. P.1890-1894.
- Naruto S., Motoo I., Marshall G.R. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.5262-5270.
- White E.H., Roswell D.F., Poltizer L.R., Branchini B.R.// Ibid. 1975. Vol.97. P.2290-2291.
- Moashery S., Ghosh S.S., Tamura S.Y., Katser E.T.// Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 1990. Vol.87. P.578-582.
- Charnas R.L., Knowles J.R.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.2732-2737.
- Cohen S.A., Pratt R.F.// Ibid. 1980. Vol.19. P.3996-4003.
- Umezawa H.// Enzyme inhibitors of microbiological origin. Tokyo: Univ.Tokyo press, 1972.
- Umezawa H.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.678-695.
- Laskowski M., Sealock R.W.// The enzymes/ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad. press, 1970. Vol.3. P.375-473.
- Proceedings of Symposium. Enzyme Inhibitors of the Kallikrein and Renin Systems., Dallas, April 4, 1979// Fed.Proc. 1979. Vol.38. P.2751-2791.
- МОСОЛОВ B.B.// Успехи биол.химии. 1981. Т.22. С.100-115.
- Proteinase inhibitors./ Ed. A.J.Barrett, G.Salvesen. N.Y.: Elsevier, 1986.
- Barrett A.J., Dingle J.T.// Biochem.J. 1972. Vol.127. P.439-441.
- McKoron M.M., Workman R.J., Gregerman R.I.// J.Biol.Chem. 1974. Vol. 249. P.7770-7774.
- Suda H., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H.// Arch.Biochem. and Biophys. 1976. Vol.177. P.196-200.
- Aoyagi T., Tobe H., Kojima F. et al.// J.Antibiot. 1978. Vol.31. P. 636-638.
- Hanada K., Tamai M., Yamagishi M. et al.// Agr. and Biol.Chem. 1978. Vol.42. P.523-528.
- Hashida S., Towatari T., Kominami E., Katunuma N.// J.Biochem. 1980. Vol.88. P.1805-1811.
- Aoyagi T.// Proc.Japan Soc.Invest.Dermatol. 1986. Vol.10. P.77-82.
- Stein R.L., Strimpler A.M.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.2611-2615.
- Kunimoto S., Aoyagi T., Morishima H. et al.// J.Antibiot. 1972. Vol. 25. P.251-255.
- Ritch D.H., Sun E., Singh J.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1977. Vol.74. P.762-767.

- Marciniaszyn J., Hartsuck J.A., Tang J.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol.95. P.199-200.
- Rich D.H., Bernatowicz M.S., Agarwal N.S. et al.// Biochemistry.1985. Vol.24. P.3165-3173.
- Jupp R.A., Dunn B.M., Jacobs J.W. et al.// Biochem.J. 1990. Vol.265. P.871-878.
- Holden H.M., Tronrud D.E., Monzingo A.F. et al.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.8542-8553.
- Kay J.// Aspartic proteinases and their inhibitors./ Ed. V.Kostka. B.; N.Y.: De Gruyter, 1985. P.1-17.
- Katoch I., Yasunaga T., Ikawa Y., Yoshinaka Y.// Nature. 1987. Vol. 329. P.654-656.
- Richards A.D., Roberts R., Dunn B.M. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol. 247. P.113-117.
- Barrett A.J.// Proteinases and their inhibitors: Proc.Intern.Symp., (Portrož, Yugosl.)/ Ed. V.Turk, Lj.Vitale. Ljubljana: Mlad.kn.; Oxford: Pergamon press, 1981. P.103-107.
- Katunuma N., Towatari T., Kominami E., Hashida S.// Ibid. P.83-92.
- Barrett A.J., Kembhavi A.A., Brown M.A. et al.// Biochem.J. 1982. Vol.201. P.189-198.
- Matsumoto K., Yamamoto D., Ohishi H. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol. 245. P.177-180.
- Wilkes S.H., Prescott J.M.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.13154-13162.
- Harbeson S.L., Rich D.H.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.7301-7310.
- Katse H., Shiohara M., Miyazaki W. et al.// J.Chem.Soc.Chem. Commun. 1979. P.726-727.
- McMurry J.E., Ertion M.D.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.2712-2720.
- Ito K., Yamasaki M.// Biochim. et biophys.acta. 1976. Vol.429. P.912-924.
- Sutherland J.H.R., Greenbaum L.M.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1983. Vol.110. P.332-338.
- Harpel P.C.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.751-760.
- Damus P.S., Rosenberg R.D.// Ibid. P.653-669.
- Schlessler H., Fink E., Fritz H.// Ibid. P.847-859.
- Greene L.J., Pudols M.H., Bartelt D.C.// Ibid.P.813-825.
- Čechová O.// Ibid. P.806-813.
- Bagdy D., Barabas E., Graf L. et al.// Ibid. P.669-678.
- Iwanaga S., Takahashi H., Suzuki T.// Ibid. P.874-881.
- Laskowski M., Kato I.// Annu.Rev.Biochem. 1980. Vol.49. P.593-626.
- Barrett A.J.// Meth.Enzymol. 1981. Vol.80, Pt C. P.737-754.
- Travis J., Morit M.// Ibid. P.765-771.
- Barrett A.J.// Ibid. C.P. 771-778.
- Hass G.M., Ryan C.A.// Ibid. P.778-792.
- Čechová D., Jonáková V.// Ibid. P.792-804.
- Seemüller U., Fritz H., Eulitz M.// Ibid. P.804-816.
- Wunderer G., Machleidt W., Fritz H.// Ibid. P.816-820.
- Travis J., Salvesen G.S.// Annu.Rev.Biochem. 1983. Vol.52. P.655-709.
- Carrell R., Travis J.// TIBS. 1985. Vol.10. P.20-24.
- Sottrup-Jensen L.// J.Biol.Chem 1989. Vol.264. P.11539-11542.
- Sato S., Murao S.// Agr. and Biol.Chem. 1973. Vol.35. P.1067-1074.
- Heimburger N., Haupt H., Schwitz H.// Proc.Intern.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors/ Ed. H.Fritz et al. B.; N.Y.: W.de Gruyter, 1971. P.1-21.
- Matheson N.R., Gibson H.L., Hallewell R.A. et al.// J.Biol.Chem.1986. Vol. 261. P.10404-10409.
- Long G.L., Chandra T., Woo S.L.C. et al.// Biochemistry. 1984. Vol. 23. P.4828-4837.
- Loeberman H., Tokuyoka R., Detsenhofer J., Huber R.// J.Mol.Biol.1984. Vol.177. P.531-556.
- Huber R., Carrell R.W.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.8951-8966.
- Rubira H., Wang Z.m., Nickbarg E.B. et al.// J.Biol.Chem. 1990. Vol. 265. P.1199-1207.
- Holmes W.E., Nelles L., Lijnen H.R., Collen D.// Ibid. 1987. Vol.262. P.1659-1664.
- Holmes W.E., Lijnen H.R., Collen D.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P. 5133-5140.
- Suzuki K., Deyashiki Y., Nishitoka J. et al.// J.Biol.Chem. 1987. Vol. 262. P.611-616.

- Bock S.C., Skriver K., Nielsen E. et al.// *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P.4292-4301.
- Hsiung L.-m., Barelay A.N., Brandon M.R. et al.// *Biochem.J.* 1982. Vol.203. P.293-298.
- Dahlback B., Podack E.R.// *Biochemistry*. 1985. Vol.24. P.2368-2374.
- Kanost M.R., Prasad S.V., Wells M.A.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P. 965-972.
- Horii A., Kobayashi T., Tomita N. et al.// *Biochem. and Biophys.Res. Commun.* 1987. Vol.149. P.635-641.
- Fioretti E., Iacopino G., Angeletti M. et al.// *J.Biol.Chem.* 1985. Vol.260. P.11451-11455.
- Fioretti E., Angeletti M., Citro G. et al.// *Ibid.* 1987. Vol.262. P. 3586-3589.
- Tschesche H., Wittig B., Decker G. et al.// *Europ.J.Biochem.* 1982. Vol.126. P.99-104.
- Weber E., Paramakos E., Bode W. et al.// *J.Mol.Biol.* 1981. Vol.149. P.109-123.
- Ardelt W., Laskowski M.// *Biochemistry*. 1985. Vol.24. P.5313-5320.
- Ванчугова Л.В., Валуева Т.А., Ромашкин В.И. и др.// *Биохимия*. 1988. Т.53. С.1455-1461.
- Mao S.J.T., Yates M.T., Blankenship D.T. et al.// *Anal.Biochem.* 1987. Vol.161. P.514-518.
- Mao S.J.T., Yates M.T., Owen Th.J., Krstenansky J.L.// *Biochemistry*. 1988. Vol.27. P.8170-8173.
- Dodt J., Köhler S., Batet A.// *FEBS Lett.* 1988. Vol.229. P.87-90.
- Braun P.J., Dennis S., Hofsteenge J., Stone S.R.// *Biochemistry*. 1988. Vol.27. P.6517-6522.
- Dunwiddie C., Thornberry N.A., Bull H.G. et al.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P.16694-16699.
- Nutt E., Gasic T., Rodkey J. et al.// *Ibid.* 1988. Vol.263. P.10162-10167.
- Ritonja A., Turk V., Gubenšek F.// *Europ.J.Biochem.* 1983. Vol.133. P. 427-432.
- McGrogan M., Kennedy J., Li M.P. et al.// *Biotechnology*. 1988. Vol.6. P.172-177.
- Birk Y.// *Meth.Enzymol.* 1976. Vol.45, Pt.B. P.700-707.
- McPhalen C.A., James M.N.G.// *Biochemistry*. 1987. Vol.26. P.261-269.
- McWhorter Ch.A., Walkenhorst W.F., Campbell E.J., Glover G.I.// *Biochemistry*. 1989. Vol.28. P.5708-5714.
- Christensen U., Ishida S., Ishii S.-i. et al.// *J.Biochem.* 1985. Vol. 98. P.1263-1274.
- Franke A.E., Danley D.E., Kocmarek F.S. et al.// *Biochim. et biophys.acta*. 1990. Vol.1037. P.16-23.
- Müller-Esterl W., Fritz H., Kellermann J. et al.// *FEBS Lett.* 1985. Vol.191. P.221-226.
- Turk V., Brzin J., Conger M. et al.// *Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol. Chem.* 1983. Vol.364. P.1487-1496.
- Abrahamson M., Ritonja A., Brown M.A. et al.// *J.Biol.Chem.* 1987. Vol.262. P.9688-9694.
- Bode W., Engl R., Musil D. et al.// *EMBO J.* 1988. Vol.7. P.2593-2599.
- Lenney J.F., Tolan J.R., Sugai W.J., Lee A.E.// *Europ.J.Biochem.* 1979. Vol.101. P.153-161.
- Kominami E., Wakamatsu N., Katuruma N.// *J.Biol.Chem.* 1982. Vol.257. P.14648-14652.
- Evans H.J., Barrett A.J.// *Biochem.J.* 1987. Vol.246. P.795-797.
- Isemura S., Saitoh E., Sanada K.// *J.Biochem.* 1987. Vol.102. P.693-704.
- Htwsa T., Yokoyama S., Ha J.-M. et al.// *FEBS Lett.* 1987. Vol.211. P.23-26.
- Ritoja A., Kopitar M., Jerala R., Turk V.// *Ibid.* 1989. Vol.255. P. 211-214.
- Laber B., Krieglstein K., Henshen A. et al.// *Ibid.* Vol.248. P.162-168.
- Machleidt W., Borchart V., Fritz H. et al.// *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol.Chem.* 1983. Vol.364. P.1481-1486.
- Lenney J.F., Liao J.R., Sugg S.L. et al.// *Biochem. and Biophys.Res. Commun.* 1982. Vol.108. P.1581-1587.
- Rohltch S.T., Levy H., Rifkin D.B.// *Biol.Chem.Hoppe-Seyler's.* 1985. Vol.366. P.147-155.
- Ritonja A., Machleidt W., Barrett A.J.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1985. Vol.131. P.1187-1192.

- Brzin J., Popovic T., Turk V. et al.// Ibid. 1984. Vol.118. P.103-109.
- Salvesen G., Parkes C., Abrahamson M. et al.// Biochem.J. 1986. Vol. 234. P.429-434.
- Higashiyama S., Ohkubo I., Ishiguro H. et al.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.1669-1675.
- Kellermann J., Haupt H., Auerwald E.A., Müller-Esterl W.// J.Biol. Chem. 1989. Vol.264. P.14121-14128.
- Björk J., Ylänperä K. // Biochemistry. 1990. Vol.29. P.1770-1776.
- Иевлева Е.В., Зимацева А.В., Мосолов В.В.// Биохимия. 1987. Т.52. С. 1786-1791.
- Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S. et al.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.2364-2370.
- Kawasaki H., Emori Y., Imajoh-Oht S. et al.// J.Biochem. 1989. Vol. 106. P.274-281.
- Heinrikson R.L., Kezdy F.J.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P. 740-751.
- Зимацева А.В., Иевлева Е.В., Мосолов В.В.// Биохимия. 1984. Т.49. С. 1153-1158.
- Зимацева А.В., Иевлева Е.В., Мосолов В.В.// Там же. 1988. Т.53. С. 740-745.
- Valler M.J., Kay J., Aoyagi T., Dunn B.M.// J.Enzyme Inhibit. 1985. Vol.1. P.77-82.
- Homandberg G.A., Litwiler R.D., Peanasky R.J.// Arch. Biochem. and Biophys. 1989. Vol.270. P.153-161.
- Ueno N., Miyazaki H., Hirose S., Murakami K.// J.Biol.Chem.1981. Vol. 256. P.12023-12027.
- Birk Y.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.728-739.
- Mareš M., Meloun B., Pavlik M. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol.251. P. 94-98.
- Hass G.M., Hermanson M.A.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.2256-2260.
- Murat H., Hara S., Ikenaka T. et al.// J.Biochem. 1985. Vol.97. P. 173-180.
- Cawston T.E., Murphy G., Mercer E. et al.// Biochem.J. 1983. Vol.211. P.313-318.
- Boone T.C., Johnson M.J., de Clerck Y.A., Landley F.E.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1990. Vol.87. P.2800-2804.
- Vitro G.D., Travis J.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.8870-8874.
- Tschesche H., Dietl T.// Meth.Enzymol. 1976. Vol.45, Pt.B. P.772-792.
- Beckmann J., Mechlich A., Schroder W. et al.// Europ.J.Biochem. 1988. Vol.176. P.675-682.
- Richarz R., Tschesche H., Wüthrich K.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.5711-5715.
- Nikawa T., Towatari T., Tke Y., Katunuma N.// FEBS Lett. 1989. Vol. 255. P.309-314.
- Salvesen G.S., Barrett A.J.// Biochem.J. 1980. Vol.187. P.695-701.
- Barrett A.J., Starkey P.M.// Ibid. 1973. Vol.133. P.709-724.
- Christensen U., Sottrup-Jensen L.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P. 6619-6626.
- Feldman S.R., Gontas S.L., Pizzo S.V.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P.5700-5704.
- Favaron V., Tourbez M., Pochon F. et al.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.165. P.31-37.
- Sottrup-Jensen L., Sand O., Kristensen L., Fey G.H.// J.Biol.Chem. 1989. Vol.264. P.15781-15789.
- Hass G.M., Ryan C.A.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1980. Vol.97. P.1481-1486.
- Hass G.M., Ake H., Grahn D.T., Neurath H.// Biochemistry. 1976. Vol. 15. P.93-100.
- Homandberg G.A., Minor S.T., Peanasky R.J.// Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol.612. P.384-394.
- Pauling L.// Chem.Eng.News. 1946. Vol.24. P.1375-1379.
- Wolfenden R.// Nature. 1969. Vol.223. P.704-705.
- Lienhard G.E.// Science. 1973. Vol.180. P.149-154.
- Wolfenden R.// Annu.Rev.Biophys. and Bioeng. 1976. Vol.5. P.271-306.
- Антонов В.К., Иванова Т.В., Березин И.В., Мартинек К.// ДАН СССР. 1968. Т.183. С.1435-1438.
- Antonov V.K., Ivanina T.V., Ivanova A.G. et al.// FEBS Lett. 1972. Vol.20. P.37-40.
- Lindquist R.N., Nguyen A.C.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.6435-6437.

2850. Matteson D.S., Sadhu K.M., Lienhard G.E.// Ibid. 1981. Vol.103. P. 5241-5242.
2851. Philipp M., Maripuri S.// FEBS Lett. 1981. Vol.133. P.36-38.
2852. Kettner Ch.A., Shenvt A.B.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.15106-15114.
2853. Kato Y., Kido H., Fukusen N., Katunuma N.// J.Biochem. 1988. Vol.103. P.820-822.
2854. Klener P.A., Waley S.G.// Biochem.J. 1978. Vol.169. P.197-204.
2855. Bessley T., Gascogne N., Knott-Hunziker V. et al.// Ibid. 1983. Vol. 209. P.229-233.
2856. Shenvt A.B.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.1286-1291.
2857. Ротанова Т.В., Клаус Р., Иванова А.Г.// Биооргани. химия. 1976. Т.2. С.837-845.
2858. Ярв Я.Я., Спээк М.А., Лангелъ Ю.П., Ротанова Т.В.// Там же. 1978. Т. 4. С.1364-1371.
2859. Imperiati B., Abeles R.H.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.3760-3767.
2860. Breaux E.J., Bender M.L.// FEBS Lett. 1975. Vol.56. P.81-84.
2861. Kettner Ch.A., Bone R., Agard D.A., Bachouchin W.W.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.7682-7688.
2862. Rotanova T.V., Ivanova A.G., Antonov V.K. et al.// Intern.J.Peptide and Protein Res. 1976. Vol.8. P.225-231.
2863. Ротанова Т.В., Васильева Н.В., Гиноджан Л.М., Антонов В.К.// Биооргани.химия. 1978. Т.4. С.694-697.
2864. Nakatani H., Morita T., Hiromi K.// Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol.525. P.423-428.
2865. Швабас В.-Ю.К., Класов А.А., Березин И.В. и др.// III Всесоюз. симп. "Структура и функция активных центров ферментов": Тез.докл. Пушино-на-Оке, 1976. С.25.
2866. Иомитова В.М., Блазоев Б.Б., Ротанова Т.В., Антонов В.К.// Биооргани. химия. 1982. Т.8. С.1659-1665.
2867. Tanizawa K., Kanaoka Y., Wos J.D., Lawson W.B.// Biol.Chem.Hoppe-Seyler's. 1985. Vol.366. P.871-878.
2868. Westerik J.O'C., Wolfenden R.// J.Biol.Chem. 1974. Vol.249. P.6351-6353.
2869. Lewis Ch.A., Wolfenden R.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.4890-4895.
2870. Tsujinaka T., Kajitwara Y., Kambayashi J. et al.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. Vol.153. P.1201-1208.
2871. Galardy R.E., Kartylewicz Z.P.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.2083-2087.
2872. Gorinstein D.G., Shah D.O.// Ibid. 1982. Vol.21. P.4679-4686.
2873. Tarnus C., Jung M.J., Remy J.-M. et al.// FEBS Lett. 1989. Vol.249. P.47-50.
2874. Tulinsky A., Maurits I., Mann R.F.// J.Biol.Chem. 1978. Vol.253. P. 1074-1078.
2875. Matthews D.A., Alden R.A., Birktoft J.J. et al.// Ibid. 1975. Vol. 250. P.7120-7126.
2876. Bone R., Shenvt A.B., Kettner Ch. A., Agard D.A.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.7609-7614.
2877. Takahashi L.H., Radhakrishnan R., Rosenfeld R.E., Meyer E.F.// Ibid. 1989. Vol.28. P.7610-7617.
2878. Adebodun F., Jordan P.// J.Amer.Chem.Soc. 1989. Vol.110. P.309-310.
2879. Bachouchin W.W., Wong W.Y.L., Farr-Jones S. et al.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.7689-7697.
2880. Nakatani H., Hiromi K.// Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol.524. P. 413-417.
2881. Andersson L., Isley T.C., Wolfenden R.// Biochemistry. 1982. Vol.21. P.4177-4180.
2882. Fehrentz J.-A., Hettz A., Castro B. et al.// FEBS Lett. 1984. Vol. 167. P.273-276.
2883. Grobelny D., Galardy R.E.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.1072-1078.
2884. Frick L., Wolfenden R.// Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol.829. P. 311-318.
2885. Mackenzie N.E., Grant S.K., Scott A.I., Malthouse J.P.G.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.2293-2298.
2886. Mattie J.A., Henes J., Fruton J.S.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P. 6776-6782.
2887. Takahashi L.H., Radhakrishnan R., Rosenfeld R.E. et al.// J.Amer. Chem.Soc. 1989. Vol.111. P.3368-3374.
2888. Liang T.-Ch., Abeles R.H.// Biochemistry. 1987. Vol.26. P.7603-7608.
2889. Grobelny D., Teater C., Galardy R.E.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. Vol.159. P.426-431.

- Mockhtiar K.A., Grobelny D., Galardy R.E., Wart H.E.v.// Biochemist-ry. 1988. Vol.27. P.4299-4304.
- Bartlett P.A., Marlow Ch.K.// Ibid. 1983. Vol.22. P.4618-4624.
- Yamauchi K., Ohtsuki S., Ktnoshita M.// Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol.827. P.275-282.
- Tronrud D.E., Monzingo A.F., Matthews B.W.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.157. P.261-268.
- Nakatani H., Hiromi K., Satoi S. et al.// Biochim. et biophys. acta. 1975. Vol.391. P.415-421.
- Marciniak J., Hartsuck J.A., Tang J.// J.Biol.Chem. 1976. Vol.251. P.7088-7094.
- Steiner S.A., Castellino F.J.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.609-617.
- Steiner S.A., Castellino F.J.// Ibid. P.1136-1141.
- Leestienne P., Bleth J.G.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.9289-9294.
- Schechter J., Zazepizki E.// Europ.J.Biochem. 1971. Vol.18. P.469-473.
- Wang T.T., Dorrington K.J., Hofmann Th.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1974. Vol.57. P.865-869.
- Зимченко А.А., Рухи Л.Д., Антонов В.К.// Биоорг.химия. 1978. Т.4. С.1122-1128.
- Зимченко А.А., Рухи Л.Д., Гуноджан Л.М., Антонов В.К.// Там же. 1981. Т.7. С.1195-1200.
- Silver M.S., James S.L.T.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.3183-3189.
- Silver M.S., James S.L.T.// Ibid. P.3177-3182.
- Inagami T., Hatano H.// J.Biol.Chem. 1969. Vol.244. P.1176-1182.
- Seydoux F., Counly G., Yon J.// Biochemistry. 1971. Vol.10. P.2284-2290.
- Vajda T., Szabo T.// Europ.J.Biochem. 1978. Vol.85. P.121-124.
- Huang J.S., Tang J.// Fed.Proc. 1977. Vol.36. P.892.
- Dionysion-Asterion A., Rakitets E.T.// Biochem.J. 1979. Vol.177. P.355-356.
- Watabe S., Yago N.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1983. Vol.110. P.934-939.
- Pillat S., Botti R., Zull J.E.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.9724-9728.
- Pillat S., Zull J.E.// Ibid. 1985. Vol.260. P.8384-8389.
- Chung C.H., Goldberg A.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1982. Vol.79. P.795-799.
- Erlanger B.F., Wasserman N.H., Cooper A.G.// Biochem. and Biophys. Res.Comm. 1973. Vol.52. P.208-215.
- Goto S., Hess G.P.// J.Biochem. 1979. Vol.85. P.961-965.
- Akanuma H., Yamasaki M.// Ibid. P.775-783.
- Christensen U.// Biochim. et biophys.acta. 1978. Vol.526. P.194-201.
- Neet K.E., Atnelle G.R.// TIBS. 1976. Vol.1. P. 145.
- Курганов Б.И.// Молекуляр.биология. 1982. Т.16. С.424-433.
- Kvamme E., Tveit B., Svenneby G.// J.Biol.Chem. 1970. Vol.245. P.1871-1877.
- Kvamme E., Svenneby G., Tveit B.// Regulation of enzyme activity and allosteric interactions. / Ed. E.Kvamme, A.Pihl. Oslo: Univ. forl., 1968. P.89.
- Olsen B.R., Svenneby G., Kvamme E. et al.// J.Mol.Biol. 1970. Vol.52. P.239-245.
- Na K.-J., Lee H.-L.// Arch.Biochem. and Biophys. 1983. Vol.227. P.580-586.
- Röhm K.-H.// Ibid. 1985. Vol.239. P.216-225.
- Goldberg A.L., Waxman L.// J.Biol.Chem. 1985. Vol.260. P.12029-12034.
- Gorter J., Gruber M.// Biochim. et biophys. acta. 1970. Vol.198. P.546-555.
- Lin T.-Y., Fletcher D.S.// J.Biol.Chem. 1980. Vol.255. P.7756-7762.
- Camilo S.M., Markus G., Evers J.L., Robika G.H.// Thromb.Res. 1980. Vol.17. P.697-706.
- Martin C.J.// Biochemistry. 1964. Vol.3. P.1635-1642.
- Papadannou S., Litner I.E.// J.Chromatogr. 1968. Vol.32. P.746-756.
- Ingram V.M.// Nature. 1951. Vol.167. P.83-84.
- Blumenfeld O.O., Leone J., Perlmann G.E.// J.Biol.Chem. 1960. Vol.235. P.379-382.
- Foltmann B.// C.r.trav.Lab.Carlsberg. 1962. Vol.32. P.425-437.
- Stuyterman L.A.A., Wijdenes J.// Europ.J.Biochem. 1980. Vol.113. P.189-193.
- Glaser A.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1969. Vol.64. P.235-240.

- Maroux S., Rovey M., Desnuelle P.// *Biochim. et biophys. acta.* 1967. Vol.140. P.377-380.
- Лондон Ф.// *Успехи физ.наук.* 1937. Т.18. С.421-435.
- Brant D.A., Flory P.J.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1965. Vol.87. P.2791-2800.
- Warshel A., Levitt M.// *J.Mol.Biol.* 1976. Vol.103. P.227-249.
- Levitt M.// *Ibid.* 1974. Vol.82. P.393-420.
- Nemethy G.// *Angew.Chem.* 1967. Vol.79. P.260-271.
- Leo A., Hansch C., Elkins D.// *Chem.Rev.* 1971. Vol.71. P.525-616.
- Hermann R.B.// *J.Phys.Chem.* 1972. Vol.76. P.2754-2759.
- Chothia C.// *Nature.* 1974. Vol.248. P.338-339.
- Abraham M.N.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1980. Vol.102. P.5910-5912.
- Cordes E.H., Gittler C.// *Progress in bioorganic chemistry/ Ed. E.T. Kaiser, F.J.Kozdy. N.Y.: J.Wiley, 1973. Vol.2. P. 1-53.*
- Fersht A.R.// *TIBS.* 1987. Vol.12. P.301-304.
- Schowen R.L.// *J.Pharm.Sci.* 1973. Vol.56. P.931-943.
- Mares M., Searles S., Leighly E.M., Mohrman D.W.// *J.Amer.Chem. Soc.* 1954. Vol.76. P.3983-3987.
- Rubin J., Panson G.S.// *J.Phys.Chem.* 1965. Vol.69. P.3089-3091.
- Tabushi I., Kiyosuke Y., Yamamura K.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1981. Vol. 103. P.5255-5257.
- Gräf L., Jancsó A., Szilagyi L., Hrgy G. et al.// *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* 1988. Vol.85. P.4961-4965.
- Deranleau D.A.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1969. Vol.91. P.4044-4049.
- Deranleau D.A., Schwyzner R.// *Biochemistry.* 1969. Vol.9. P.126-134.
- Burley S.K., Petsko G.A. // *J.Amer.Chem.Soc.* 1986. Vol.108. P.7995-8001.
- Nemethy G., Scheraga N.A.// *Biochem. and Biophys. Res.Comm.* 1981. Vol.98. P.482-487.
- Reid K.S.C., Lindley P.F., Thornton J.M.// *FEBS Lett.* 1985. Vol.190. P.209-213.
- Smoluchowski M.V.// *Ztschr.Phys.Chem.* 1917. Vol.92. P.129-152.
- Walte T.R.// *Phys.Rev.* 1957. Vol.107. P.463-470.
- Bronsted J.N.// *Ztschr.Phys.Chem.* 1925. Vol.115. P.337-351.
- Alberty R.A., Hammes G.G.// *J.Phys.Chem.* 1958. Vol.62. P.154-159.
- Scatchard G. // *Proteins, aminoacids and peptides/ Ed. E.J.Cohn, J.T. Edsall. N.Y.: Reinold, 1943.*
- Hammes G.G., Alberty R.A.// *J.Phys.Chem.* 1959. Vol.63. P.274- 279.
- Hippel P.H.v., Berg O.G.// *J.Biol.Chem.* 1989. Vol.264. P.675-678.
- Chou K.-C., Li T.-T., Zhou G.-Q.// *Biochim. et biophys. acta.* 1980. Vol.657. P.304-308.
- Мельниц-Хьюз Э.А.// *Физическая химия. М.: Изд-во иностр.лит., 1962. Т. 2. С.636.*
- Hirohara H., Philipp M., Bender M.L.// *Biochemistry.* 1977. Vol.16. P. 1573-1580.
- Smallcombe S.H., Ault B., Richards J.H.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1972. Vol. 94. P.4585-4590.
- Havsteen B.H.// *J.Biol.Chem.* 1967. Vol.242. P.769-771.
- Quast U., Engel J., Heumann H. et al.// *Biochemistry.* 1974. Vol.13. P.2512-2520.
- Koren R., Hammes G.G.// *Ibid.* 1976. Vol.15. P.1165-1171.
- Johannin G., Yon J.// *Biochem. and Biophys.Res.Comm.* 1966. Vol.25. P.320-325.
- Haynes R., Feeney R.E.// *Biochemistry.* 1968. Vol.7. P.2879-2875.
- Vincent J.-P., Peron-Renner M., Pudles J., Lazdunski M.// *Ibid.* 1974. Vol.13. P.4205-4211.
- Uehara Y., Tomomura B., Hiromi K.// *Arch.Biochem. and Biophys.* 1980. Vol.202. P.250-258.
- Sachdev G.P., Fruton J.S.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 1975. Vol.72. P. 3424-3427.
- Kitagishi K., Nakatani H., Hiromi K.// *J.Biochem.* 1980. Vol.87. P. 573-579.
- Kam C.-M., Nishino N., Powers J.C.// *Biochemistry.* 1979. Vol.18. P. 3032-3038.
- Hammes G.G.// *Pure and Appl.Chem.* 1974. Vol.40. P.525-543.
- Hammes G.G., Knoche W.// *J.Chem.Phys.* 1966. Vol.45. P.4041-4048.
- Grunwald E., Ralph E.K.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1967. Vol.89. P.4405-4411.
- Hess G.P.// *The enzymes/ Ed. P.Boyer. N.Y.: Acad.press, 1971. Vol.3. P.213-248.*
- Rodier F.J.L., Ilgenfritz G.// *Europ.J.Biochem.* 1982. Vol.128. P.451-454.

- Maehler R., Whittaker J.R.// Biochemistry. 1982. Vol.21. P.4621-4633.
 Goto S., Hees G.P.// J.Biochem. 1979. Vol.86. P.619-625.
 Kuramochi H., Nakata H., Ishii Sh-t.// Ibid. P.1403-1410.
 Zhou J.-M., Liu C., Tsou C.-L.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.1070-1076.
 Nilsson T., Witman B.// Europ.J.Biochem. 1983. Vol.129. P.663-667.
 Harrison L.W., Vallee B.L.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.4359-4363.
 Kitagishi K., Hiromi K.// J.Biochem. 1986. Vol.99. P.191-197.
 Kitagishi K., Hiromi K.// Ibid. 1983. Vol.93. P.55-59.
 Yon J.M.// Biochimie. 1976. Vol.58. P.61-69.
 Lobb R.R., Auld D.S.// Fed.Proc. 1977. Vol.36. P.877.
 Dunn B.M., Pham Ch., Ranev L., et al.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.7206-7211.
 Dunn B.M.// Arch.Biochem. and Biophys. 1982. Vol.214. P.763-771.
 Geoghegan K.F., Galdes A., Hanson G. et al.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.4669-4674.
 Nakatani H., Hiromi K., Kitagishi K.// Arch. Biochem. and Biophys. 1988. Vol.263. P.311-314.
 Rosenberry T.// Adv.Enzymol. 1975. Vol.43. P.103-218.
 Knorre D.G.// FEBS Lett. 1975. Vol.58. P.50-52.
 Антонов И.Б., Дубкин С.М., Карпейский М.Я. и др.// Биооргани.химия. 1978. Т.4. С.388-396.
 Schuber F., Travo P., Pascal M.// Bioorg.Chem. 1979. Vol.8. P.83-89.
 Scheider W.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1979. Vol.76. P.2283-2287.
 Garland F., Cheung H.C.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.5281-5289.
 Raju E.V., Humphreys R.E., Fruton J.S.// Ibid. 1972. Vol.11. P.3533-3536.
 Pohl J., Dunn B.M.// Ibid. 1988. Vol.27. P.4827-4834.
 Thompson R.C., Bauer C.-A.// Ibid. 1979. Vol.18. P.1552-1558.
 Grobely D., Golt U.B., Galardy R.E.// Ibid. 1989. Vol.28. P.4948-4951.
 Ross P.D., Subramanian S.// Ibid. 1981. Vol.20. P.3096-3102.
 Menegatti E., Guarnieri M., Bolognesi M. et al.// J.Mol.Biol. 1984. Vol.176. P.425-430.
 Takahashi K., Fukada H.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.297-300.
 Platzer K.E.B., Momany P.A., Scheraga H.A.// Intern. J. Peptide and Protein Res. 1972. Vol.4. P.201-219.
 Naray-Szabo G.// J.Amer.Chem.Soc. 1984. Vol.106. P.4584-4589.
 Goodford P.J.// J.Med.Chem. 1985. Vol.28. P.849-857.
 Wong Ch.F., McCammon J.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol.108. P.3830-3832.
 Witpf G., Dearing A., Wetner P.K. et al.// Ibid. 1983. Vol.105. P.997-1005.
 Schultz R.M., Varma-Nelson P., Peters J.R., Treadway W.J.// J.Biol. Chem. 1979. Vol.254. P.12411-12418.
 Yung B.Y.K., Trowbridge C.G.// Ibid. 1980. Vol.255. P.9724-9730.
 Tellam R., Jersey J., Wtnzor D.J.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.5316-5321.
 Koshland D.E.// Adv.Enzymol. 1960. Vol.22. P.45-98.
 Bode W., Schwager P., Huber R.// J.Mol.Biol. 1978. Vol.118. P.99-112.
 Huber R.// Biological function of proteinases: 30 colloq., Mosbach./ Ed. H.Holzer, H.Tschesche. B.; Heidelberg; N.Y.: Springer, 1979. P.1-16.
 Griffith O.W., Meister A.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.4392-4397.
 Leek A.M., Chothia C.// J.Mol.Biol. 1984. Vol.174. P.175-191.
 Ионов Е.М.// Молекуляр.биология. 1977. Т.11. С.5-41.
 Ulmer D.D., Vallee B.L.// Adv.Enzymol. 1965. Vol.27. P.37-104.
 Perkins H.R., Ghuyesen J.M., Frere J.M., Nteto M.// Protein-ligand interactions./ Ed. H.Sund, G.Blauer. B.; N.Y.: de Gruyter, 1975. P.372-384.
 Nakatani H., Kitagishi K., Hiromi K.// Biochim. et biophys.acta.1976. Vol.452. P.521-524.
 Martin J.L., Caplow M.// J.Amer.Chem.Soc. 1971. Vol.93. P.5560-5566.
 Boning W., Havsteen B.H.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.6836-6843.
 Burr M.E., Koshland D.E.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1964. Vol.52. P.1017-1020.
 Литвинштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974.
 Brand L., Seltzer C.J., Turner D.C.// Probes of structure and function of macromolecules and membrane. N.Y.; L.: Acad. press, 1971. P.17-40.

- Klesov A.A., Vam B.L.// Биосинтез. 1977. Т.3. С.958-963.
 Scheule R.K., Han S.L., Wart H.E.v. et al.// Biochemistry. 1981. Vol. 20. P.1778-1784.
 Wart H.E.v., Vallee B.L., Scheule R.H., Scheraga H.A.// TIBS. 1981. Vol.6. P.316-318.
 Dimicoli J.L., Lam-Tank H., Toma F., Fermandjian S.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.3173-3180.
 Kitson D.H., Hagler A.T.// Ibid. 1988. Vol.27. P.7176-7180.
 Stoddard B.L., Bruhnke J., Porter N. et al.// Ibid. 1990. Vol.29. P. 4871-4879.
 Tujtinsky A., Bleutins R.A.// J.Biol.Chem. 1987. Vol.262. P.7737-7743.
 Grutter M.G., Fendrich G., Huber R., Bode W.// EMBO J. 1988. Vol.7. P.345-351.
 Blow D.H., Wright C.S., Kukla D. et al.// J.Mol.Biol. 1972. Vol.69. P.137-144.
 Fujinaga M., Steelecki A.K., Read R.J. et al.// Ibid. 1987. Vol.195. P.397-418.
 Rühlmann A., Kukla D., Schwager P. et al.// Ibid. 1973. Vol.77. P. 417-436.
 Huber R., Kukla D., Bode W. et al.// Ibid. 1974. Vol.89. P.73-101.
 Marquart M., Walter J., Detsenhofer J. et al.// Acta crystallogr. 1983. Vol.39B. P.480-490.
 Sweet R.M., Wright H.T., Janin J. et al.// Biochemistry. 1974. Vol. 13. P.4212-4218.
 Huges D.L., Steker L.C., Blith J., Dimicoli J.L.// J.Mol.Biol. 1982. Vol.162. P.645-658.
 Meyer E.F., Radhakrishnan R., Cole G.M., Presta L.G.// Ibid. 1986. Vol.189. P.533-539.
 Radhakrishnan R., Presta L.G., Meyer E.F., Wildonger R.// Ibid. 1987. Vol.198. P.417-424.
 Meyer E.F., Clore G.M., Gronenborn A.M., Hansen H.A.S.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.725-730.
 Navia N.A., McKeever B.M., Springer J.P. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1989. Vol.86. P.7-11.
 Bode W., Wei A.-Z., Huber R. et al.// EMBO J. 1986. Vol.5. P.2453-2458.
 Bode W., Mayr I., Baumann U. et al.// Ibid. 1989. Vol.8. P.3767-3775.
 Chen Z., Bode W.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.164. P.283-311.
 Bone R., Frank D., Kettner C.A., Agard D.A.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.7600-7609.
 Bode W., Papamokos E., Musil D.// Europ.J.Biochem. 1987. Vol.166. P. 673-692.
 McPhalen C.A., Svendsen I., Jonassen I., James M.N.G.// Proc. Nat. Acad. Sci.USA. 1985. Vol.82. P.7242-7246.
 Hirono S., Akagawa H., Mitsui Y., Iitaka Y.// J.Mol.Biol. 1984. Vol. 178. P.389-413.
 Wright C.S.// Ibid. 1972. Vol.67. P.151-163.
 Robertus J.D., Alden R.A., Birktoft J.J. et al.// Biochemistry. 1972. Vol.11. P.2439-2449.
 Poulos T.L., Alden R.A., Freer S.T. et al.// J.Biol.Chem. 1976. Vol. 251. P.1097-1103.
 Delbaere L.T.J., Brayer G.D.// J.Mol.Biol. 1985. Vol.183. P.89-103.
 James M.N.G., Steelecki A.R., Brayer G.D. et al.// Ibid. 1980. Vol. 144. P.43-88.
 Brayer G.D., Delbaere L.T.J., James M.N.G. et al.// Proc.Nat.Acad. Sci.USA. 1979. Vol.76. P.96-100.
 James M.N.G., Brayer G.D., Delbaere L.T.J. et al.// J.Mol.Biol. 1980. Vol.139. P.423-438.
 Read R.J., Fujinaga M., Steelecki A.R., James M.N.G.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.4420-4433.
 Gros P., Betzel C., Dauter Z. et al.// J.Mol.Biol. 1989. Vol.210. P. 347-367.
 Betzel Ch., Pal G.P., Struck M. et al.// FEBS Lett. 1986. Vol.197. P. 105-110.
 Varughese K.I., Ahmed F.R., Carey P.R. et al.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.1330-1332.
 Andreeva N.S., Zdanov A.S., Gustchina A.E., Fedorov A.A.// J.Biol. Chem. 1984. Vol.259. P.11353-11365.
 James M.N.G., Steelecki A., Salturo F. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1982. Vol.79. P.6137-6141.
 James M.N.G., Steelecki A., Hofman Th. // Aspartic proteinases and

- their inhibitors./ Ed. V.Kostka. B.; N.Y.: Walter de Gruyter, 1985. P.163-177.
- Šalt A., Veerapandian B., Cooper J.B. et al.// EMBO J. 1989. Vol.8. P.2179-2188.
- Cooper J.B., Foundling S.I., Blundell T.L. et al.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.8596-8603.
- Bott R., Subramanian E., Davies D. // Ibid. 1982. Vol.21. P.6956-6962.
- Suguna K., Padlan E.A., Smith C.M. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1987. Vol.84. P.7009-7013.
- Christianson D.W., Lipscomb W.N.// J.Amer.Chem.Soc. 1987. Vol.109. P.5536-5538.
- Christianson D.W., Lipscomb W.N.// Ibid. 1986. Vol.108. P.4998-5003.
- Christianson D.W., Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1986. Vol.83. P.7568-7572.
- Shoham G., Christianson D.W., Oren D.A.// Ibid. 1988. Vol.85. P.684-688.
- Kim H., Lipscomb W.N.// Biochemistry. 1990. Vol.29. P.5546-5555.
- Rees D.S., Lipscomb W.N.// J.Mol.Biol. 1982. Vol.160. P.475-498.
- Kester W.R., Matthews B.W.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.2506-2516.
- Bologniet M.C., Matthews B.W.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.634-639.
- Weaver L.H., Kester W.R., Matthews B.W.// J.Mol.Biol. 1977. Vol.114. P.119-132.
- Holden H.M., Matthews B.W.// J.Biol.Chem. 1988. Vol.263. P.3256-3260.
- Monzingo A.F., Matthews B.W.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P.5724-5729.
- Kelly J.A., Knox J.R., Zhao H. et al.// J.Mol.Biol. 1989. Vol.209. P.281-295.
- Morgan R.S., Miller S.L., McAdon J.M.// Ibid. 1979. Vol.127. P.31-39.
- Mitsusaki K., Sugahara Y., Tsunematsu H., Maksumi S.// J. Biochem. 1986. Vol.100. P.21-25.
- Gertg J.T., Rimerman R.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.7565-7569.
- Carey P.R., Ozaki Y., Storer A.C.// Biochem. and Biophys.Res. Commun. 1983. Vol.117. P.725-731.
- Storer A.C., Lee H., Carey P.R.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.4789-4796.
- Годжаев Н.Н., Алиев Р.Э., Попов Е.М.// Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С.102-119.
- Bologniet M., Gatti G., Menegatti E. et al.// J.Mol.Biol. 1982. Vol.162. P.839-868.
- Bode W., Walter J., Huber R. et al.// J.Biochem. 1984. Vol.144. P.185-190.
- Hunkapiller M.W., Forgac M.D., Yu E.Ho., Richards J.H. // Biochem. and Biophys.Res.Commun. 1979. Vol.87. P.25-31.
- Baillargeon M.W., Laskowski M., Neves D.E. et al.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.5703-5710.
- Shah D.O., Gorenstein D.G.// Ibid. 1983. Vol.22. P.6096-6101.
- Argade P.V., Gerke G.K., Weber Y.P., Petticolas W.L.// Ibid. 1984. Vol.23. P.299-304.
- Weber J.A., Turpin P.-Y., Bernhard S.A., Petticolas W.L.// Ibid. 1986. Vol.25. P.1912-1917.
- Huber C.P., Ozaki Y., Pliura D.H. et al.// Ibid. 1982. Vol.21. P.3109-3115.
- Pearl L.H.// FEBS Lett. 1987. Vol.214. P.8-12.
- Hofmann T., Allen B., Bendtner M. et al.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.1140-1146.
- Harrison R.K., Stein R.L.// Ibid. 1990. Vol.29. P.1684-1689.
- Gertg J.T., Halley B.A.// Arch.Biochem. and Biophys. 1984. Vol.232. P.467-476.
- McPhalen C.A., James M.N.G.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.6582-6598.
- Shotton D.M., Watson H.C.// Philos.Trans.Royal Soc.London. 1970. Vol. 257B. P.111-125.
- Papamokos E., Weber E., Bode W. et al.// J.Mol.Biol. 1982. Vol.158. P.515-537.
- Bauer C.-A.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.375-380.
- Bode W., Schwager P., Huber R.// Proteolysis and physiological regulation: Miami Winter Symp./ Ed. D.W.Ribbons, K.Brew. N.Y.: Acad. press, 1976. Vol.11. P.43-76.

- Treadway W.J., Schultz R.M.// *Biochemistry*. 1976. Vol.15. P.4171-4174.
- Landis B.H., Berliner L.J.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1980. Vol.102. P.5350-5354.
- Landis B.H., Berliner L.J.// *Ibid.* P.5354-5358.
- Bittner E.W., Gerig J.T.// *Ibid.* 1970. Vol.92. P.5001-5003.
- Gammon K.L., Smallcombe S.H., Richards J.H.// *Ibid.* 1972. Vol.94. P.4573-4580.
- Smallcombe S.H., Gammon K.L., Richards J.H.// *Ibid.* P.4581-4584.
- Gerig J.T., Loehr D.T., Luk K.F.S., Roe D.C.// *Ibid.* 1979. Vol.101. P.7482-7487.
- Vandlen R.L., Tullinsky A.// *Biochemistry*. 1973. Vol.12. P.4193-4200.
- Алиев Р.Э., Годжаев Н.Н., Попов Е.М.// *Молекуляр. биология*. 1986. Т. 20. С.346-356.
- Попов Е.М., Годжаев Н.Н., Алиев Р.Э. // Там же. С.357-368.
- Drenth J., Kalk K.H., Suen H.M.// *Biochemistry*. 1976. Vol.15. P.3731-3738.
- Lowe G., Yuthavong Y.// *Biochem.J.* 1971. Vol.124. P.107-115.
- Wolthers B.G., Drenth J., Jansontus J.N. et al.// *Proc.Intern.Symp. Structure-Function Proteolytic Enzymes/* Ed. P.Desmuelle, H.Neurath, M. Ottesen. Copenhagen: Munksgaard, 1970. P.272-288.
- Evans B.L.B., Knopp J.A., Horton H.R.// *Arch. Biochem. and Biophys.* 1981. Vol.206. P.362-371.
- Pickersgill R.W., Goodenough P.W., Summer I.S., Collins M.E.// *Biochem.J.* 1988. Vol.254. P.235-238.
- Brocklenhurst K., O'Driscoll M., Kowlessor D. et al.// *J.Biochem.* 1989. Vol.257. P.309-312.
- Андреева Н.С., Гушина А.Е., Федоров А.А.// *ДАН СССР*. 1981. Т.259. С. 1261-1264.
- James M.N.G.// *Canad.J.Biochem.* 1980. Vol.58. P.251-271.
- Blundell T.L., Cooper J., Foundling S.I. et al.// *Biochemistry*. 1987. Vol.26. P.5585-5590.
- James M.N.G., Stelekt A.R.// *Ibid.* 1985. Vol.24. P.3701-3713.
- Schmidt P.G., Bernatowicz M.S., Rich D.H.// *Ibid.* 1982. Vol.21. P. 1830-1835.
- Thomas K.A., Smith G.M., Thomas T.B., Feldmann R.J.// *Proc.Nat.Acad. Sci.USA*. 1982. Vol.79. P.4843-4847.
- Lipscomb W.N.// *Tetrahedron*: 1974. Vol.30. P.1725-1730.
- Nakagawa S., Uneyama H.// *J.Amer.Chem.Soc.* 1978. Vol.100. P.7716-7725.
- Mock W.L.// *Bioorg.Chem.* 1975. Vol.4. P.270-278.
- Mock W.L.// *Ibid.* 1976. Vol.5. P.403-414.
- Lipscomb W.N.// *Accounts Chem.Res.* 1970. Vol.3. P.81-89.
- Lipscomb W.N.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1980. Vol.77. P.3875-3878.
- Johansen J.T., Vallee B.L.// *Biochemistry*. 1975. Vol.14. P.649-659.
- Клесов А.А., Вэли Б.А.// *Биоорганич. химия*. 1977. Т.3. С.964-980.
- Rees D.C., Lipscomb W.N.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1981. Vol.78. P. 5455-5459.
- Липкин Г.М., Паслен В.В.// *Молекуляр.биология*. 1980. Т.14. С.1142-1150.
- Bender M.L.// *CRC.Crit.Rev.Biochem.* 1973. Vol.1. P.149-199.
- Stroud R.M., Krieger M., Koeppe R.E. et al.// *Proteases and biological control/* Ed. E.Reich, D.B.Rifkin, E.Shaw. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P.13-32.
- Kraut J.// *Annu.Rev.Biochem.* 1977. Vol.46. P.331-358.
- Shefer E.// *Transition states of biochemical processes/* Ed. R.D.Gandour, R.L.Schwen. N.Y.: Plenum press, 1978. P.339-352.
- Polgar L., Halasz P.// *Biochem.J.* 1982. Vol.207. P.1-10.
- Enzyme mechanisms/* Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc. Chem., 1987.
- Zannis V.I., Kirsch J.F.// *Biochemistry*. 1978. Vol.17. P.2669-2674.
- Hardman M.J., Valenzuela P., Bender M.L.// *J.Biol.Chem.* 1978. Vol. 246. P.5907-5913.
- Lawson W.B.// *Biochemistry*. 1980. Vol.19. P.2140-2144.
- Brocklenhurst K., Balnes B.S., Mushiri M.S.// *Biochem.J.* 1980. Vol. 189. P.189-192.
- Mock W.L., Tsay J.-T.// *Biochemistry*. 1986. Vol.25. P.2920-2927.
- Chan V.W.F., Jorgensen A.M., Borders C.L.// *Biochem. and Biophys.Res. Commun.* 1988. Vol.151. P.709-718.
- Mock W.L., Tsay J.-T.// *J.Biol.Chem.* 1988. Vol.263. P.8635-8641.
- Robillard G., Schulman R.G.// *J.Mol.Biol.* 1972. Vol.71. P.507-511.

- Markley J.L., Porubcan M.A.// Ibid. 1976. Vol.102. P.487-509.
- Lewis S.D., Johnson F.A., Shafer J.A.// Biochemistry. 1976. Vol.15. P.5009-5017.
- Porubcan M.A., Westler W.M., Ibañez I.B., Markley J.L.// Ibid. 1979. Vol.18. P.4108-4116.
- Primrose W.V., Scott A.I., Mackenzie N.E., Malthouse J.P.G.// Biochem. J. 1985. Vol.231. P.677-682.
- Jordan F., Polgar L., Tous G.// Biochemistry. 1985. Vol.24. P.7711-7717.
- Warschel A.// Ibid. 1981. Vol.20. P.3167-3177.
- Gilson M.K., Honig B.H.// Proteins. 1988. Vol.3. P.32-52.
- Goldblum A.// Biochemistry. 1988. Vol.27. P.1653-1658.
- Epstein J., Michel H.O., Mosher W.A. // J.Theor.Biol. 1968. Vol.19. P.320-325.
- Willenbrock F., Brocklehurst K.// Biochem.J. 1985. Vol.227. P.521-528.
- Adams E.Q.// J.Amer.Chem.Soc. 1916. Vol.38. P.1503-1510.
- Lewis S.D., Johnson F.A., Shafer J.A.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.48-51.
- Cornish-Bowden A.J., Knowles J.R.// Biochem.J. 1969. Vol.113. P.353-361.
- Johansen J.T., Vallee B.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1971. Vol.68. P.2532-2535.
- Coddling P.W., Delbaere L.T.J., Hayakawa K. et al.// Canad.J.Biochem. 1974. Vol.52. P.208-220.
- Eyers L.D., Koshland D.E., Jr.// Bioorg.Chem. 1978. Vol.7. P.15-33.
- Antonov V.K., Vorotyntseva T.I.// FEBS Lett. 1972. Vol.23. P.361-363.
- Fersht A.R., Sperling J.// J.Mol.Biol. 1973. Vol.74. P.137-149.
- Hunkapiller M.W., Smallcombe S.H., Whittaker D.R., Richards J.H.// Biochemistry. 1973. Vol.12. P.4732-4743.
- Stein R.L., Elrod J.P., Schowen R.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.2446-2452.
- Schowen R.L.// CRC Crit.Rev.Biochem. 1984. Vol.17. P.1-44.
- Scholten J.D., Hogg J.L., Rauschel F.M.// J.Amer.Chem.Soc. 1988. Vol.110. P.8246-8247.
- Bachovchin W.W., Kaiser R., Richards J.H., Roberts J.D.// Proc.Nat. Acad.Sci.USA. 1981. Vol.78. P.7323-7326.
- Westler W.M., Markley J.L., Bachovchin W.W.// FEBS Lett. 1982. Vol.138. P.233-235.
- Kosstakoff A.A., Spencer S.A.// Biochemistry. 1981. Vol.20. P.6462-6474.
- Bachovchin W.W.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P.7948-7951.
- Bachovchin W.W.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.7751-7759.
- Craik C.S., Rozenblat S., Langman C., Rutter W.J.// Science. 1987. Vol.237. P.909-913.
- Хурейн Ю.И., Бурштейн К.И.// ДАН СССР. 1974. Т.217. С.965-969.
- Schneider S., Kleiter D.A., Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA.1975. Vol.72. P.2606-2610.
- Uneyama H., Nakagawa S.// Chem. and Pharm.Bull. 1980. Vol.28. P.2292-2300.
- Uneyama H., Nakagawa S., Kudo T.// J.Mol.Biol. 1981. Vol.150. P.409-421.
- Nakagawa S., Uneyama H.// J.Mol.Biol. 1984. Vol.179. P.103-123.
- Uneyama H., Hirono S., Nakagawa S.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1984. Vol.81. P.6266-6270.
- Hamilton S.E., Zerner B.// J.Amer.Chem.Soc. 1981. Vol.103. P.1827-1831.
- Roberts J.D., Flanagan C.Y.C., Birdseye T.R.// Ibid. 1982. Vol.104. P.3945-3949.
- Pearl L., Blandell T.// FEBS Lett. 1984. Vol.174. P.96-101.
- Rees D.C., Lewis M., Honzatko R.B. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1981. Vol.78. P.3408-3412.
- Radom L., Pople J.A., Mosck W.L.// Tetrahedron Lett. 1972. P.479-482.
- Вотинюк А.А., Васильев В.В.// Молекуляр.биология. 1987. Т.21. С.807-813.
- Epand R.M., Wilson I.B.// J.Biol.Chem. 1963. Vol.238. P.1718-1723.
- Williams A.// Biochemistry. 1970. Vol.9. P.3383-3390.
- Kezdy F.J., Bender M.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1964. Vol.86. P.937-938.
- Kezdy F.J., Bender M.L.// Ibid. P.938-940.
- Kezdy F.J., Clement G.E., Bender M.L.// Ibid. P.3690-3696.

- Hlmoe A., Branät K.G., Desa R.J., Hess G.P.// J.Biol.Chem. 1969. Vol. 244. P.3483-3493.
- Breaux J.E., Bender M.L.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. Vol.70. P.235-240.
- Suedberg A.A., Pesek J.J., Fink A.L.// Anal.Biochem. 1990. Vol.186. P.153-158.
- Makinen M.W., Kuo L.C., Dymowski J.J., Jaffer S.// J.Biol.Chem. 1979. Vol.254. P.356-366.
- Lachman H., Mauser H., Schnetder Fr.// Hoppe-Seyler's Ztschr.physiol. Chem. 1972. Vol.353. P.730-731.
- Malthouse J.P.G., Gamcock M.P., Boyd A.S.F. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1982. Vol.104. P.6811-6813.
- Belasco J.G., Knowles J.R.// Fed.Proc. 1980. Vol.39. P.1667.
- Anderson E.G., Pratt R.F.// J.Biol.Chem. 1981. Vol.256. P.11401-11404.
- Cartwright S.J., Fink A.L.// FEBS Lett. 1982. Vol.137. P.186-188.
- Epanand R.M., Wilson I.B.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.1104-1107.
- Inagami T., Sturtevant J.M.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1964. Vol.14. P.69-74.
- Epanand R.M.// Ibid. 1969. Vol.37. P.313-318.
- Rasmussen J.R., Strominger J.L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1978. Vol. 75. P.84-88.
- Belajowski A.S., Frankfater A.// J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P.1645-1649.
- Fitzpatrick P.F.// Biochim.et biophys. acta. 1989. Vol.995. P.201-203.
- Akhtar M., Al-Janabi J.M.// Chem.Comm. 1969. P.1002-1003.
- Kitson T.M., Knowles J.R.// Ibid. 1970. P.361-362.
- Takahashi M., Hofmann T.// Biochem.J. 1975. Vol.147. P.549-563.
- Nakagawa Y., Ko Sun L.-H., Katser E.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1976. Vol. 98. P.1616-1617.
- Bresler S.E., Krutyakov V.M., Vlasov G.P.// Europ.J.Biochem. 1971. Vol.18. P.131-139.
- Berezin I.V., Kazanskaya N.F., Klyosov A.A., Svedas V.K.// Ibid.1973. Vol.38. P.529-535.
- Stauffer C.E., Zeffren E.// J.Biol.Chem. 1970. Vol.245. P.3282-3284.
- Bender M.L., Kemp K.C.// J.Amer.Chem.Soc. 1957. Vol.79. P.111-116.
- Bender M.L., Kemp K.C.// Ibid. P. 116-120.
- Антонов В.К., Явский Л.П., Волюкова Л.И. и др.// Биоорган.химия. 1979. Т.5. С.1427-1429.
- Antonov V.K., Gindman L.M., Rumsh L.D. et al.// Europ.J. Biochem. 1981. Vol.117. P.195-200.
- Antonov V.K.// Aspartic proteinases and their inhibitors/ Ed. V.Kostka. B.; N.Y.: de Gruyter, 1985. P.203-220.
- Попов А.А., Капитанников Ю.В., Румш Л.Д., Антонов В.К.// Биоорган.химия. 1986. Т.12. С.467-469.
- Antonov V.K., Gindman L.M., Kapitannikov Yu.V. et al.// FEBS Lett. 1978. Vol.88. P.87-90.
- Антонов В.К., Гиндман Л.М., Румш Л.Д.// Биоорган.химия. 1984. Т.10. С.1044-1058.
- Козлов Л.В., Гиндман Л.М., Орехович В.Н.// ДАН СССР. 1967. Т.172. С.1207-1209.
- Williams D.C., Whitaker J.R.// Biochemistry. 1968. Vol.7. P.2562-2569.
- Гиндман Л.М., Капитанников Ю.В., Румш Л.Д., Антонов В.К.// Биоорган.химия. 1988. Т.14. С.1641-1649.
- Nau H., Riordan J.F.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.5285-5294.
- Röhm K.H., Effen R.L.v.// Europ.J.Biochem. 1986. Vol.160. P.327-332.
- Röhm K.H., Effen R.L.v.// Arch.Biochem. and Biophys. 1986. Vol.244. P.128-136.
- Paul G., Heusden H.V., Bosch H.v.d.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. Vol.90. P.1000-1006.
- Hofmann Th., Dunn B.M., Fink A.L.// Biochemistry. 1984. Vol.23. P. 5253-5256.
- Hoffman S.J., Chu S.S.T., Lee H.H. et al.// J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.6971-6973.
- Auld D.S., Geoghegan K.G., Galde A., Vallee B.L.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.5156-5159.
- Galde A., Auld D.S., Vallee B.L.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P. 646-651.
- Auld D.S.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.240-258.

- Makinen M.W., Fukuyama J.M., Kuo L.C.// J.Amer.Chem.Soc. 1982. Vol. 104. P.2667-2669.
- Kuo L.C., Fukuyama J.M., Makinen M.W.// J.Mol.Biol. 1983. Vol.163. P. 63-105.
- Suh J., Cho W., Chung S.// J.Amer.Chem.Soc. 1985. Vol.107. P.4530-4535.
- Suh J., Hong S.-B., Chung S.// J.Biol.Chem. 1986. Vol.261. P.7112-7114.
- Pemfert U., Pfeleiderer G.// FEBS Lett. 1970. Vol.8. P.65-67.
- May S.W., Kaiser E.T.// Biochemistry. 1972. Vol.11. P.592-600.
- Kaiser E.T., Nakagawa Y.// Adv.Exp.Med. and Biol. 1977. Vol.95. P. 159-178.
- Александров С.Л., Антонов В.К., Мельников П.Н.// Молекуляр. биология. 1984. Т.18. С.1569-1575.
- Scheiner S., Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1976. Vol.73. P. 432-436.
- Fastrez J.// Europ.J.Biochem. 1983. Vol.135. P.339-341.
- Weiner S.J., Setbel G.L., Kollman P.A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1986. Vol.83. P.649-653.
- Warshel A., Russel S.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol.108. P.6569-6579.
- Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.-K.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P.3629-3637.
- Brooklenhurst K.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem., 1987. P.140-158.
- Asboth A., Polgar L.// Biochemistry. 1983. Vol.22. P.117-122.
- Asboth B., Stokum E., Khan I.V., Polgar L.// Ibid. 1985. Vol.24. P. 606-609.
- Holmes M.A., Matthews B.W.// Ibid. 1981. Vol.20. P.6912-6920.
- Kuo L.C., Makinen M.W.// J.Biol.Chem. 1982. Vol.257. P.24-27.
- Wart H.E.v., Vallee B.L.// Biochemistry. 1978. Vol.17. P.3385-3394.
- Christianson D.W., Alexander R.S.// J.Amer.Chem.Soc. 1989. Vol.111. P.6412-6419.
- Александров С.Л., Антонов В.К.// Биооргани.химия. 1990. Т.16. С.464-475.
- Antonov V.K.// Proc. 16th FEBS Congr.(1984). Moscow: VNU Sci.press, 1985. Pt.A. P.31-40.
- Войлок А.А.// Молекуляр.биология. 1987. Т.21. С.882-887.
- Mao B., Fear M.R., McCammon J.A., Northrup S.H.// J.Mol.Biol. 1981. Vol.151. P.199-202.
- Teal I.-H., Bender M.L.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.3764-3768.
- Brooklenhurst K., Malthouse J.P.G.// Biochem.J. 1981. Vol.193. P.819-823.
- Лизтеништейн Г.И.// Кинетика и катализ 1977, Т.18. С.878-882.
- Лизтеништейн Г.И.// Там же. Т.18. С.1255-1260.
- Schoven R.L.// Progr.Phys.Org.Chem. 1972. Vol.9. P.275-332.
- Minor S.S., Schoven R.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1973. Vol.95. P.2279-2281.
- Choi M.-u., Thornton E.R.// Ibid. 1974. Vol.96. P.1428-1436.
- Scheiner S., Lipscomb W.N.// Ibid. 1977. Vol.99. P.3466-3472.
- Копитанников Ю.В., Явашев Л.П., Гинюджан Л.М., Антонов В.К.// Биооргани.химия. 1983. Т.9. С.228-231.
- Wang J.H., Parker L.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1967. Vol.58. P.2451-2454.
- Wang J.H.// Science. 1968. Vol.161. P.328-334.
- Wang J.H.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1970. Vol.66. P.874-881.
- Hubbard C.D., Shoupe T.S.// J.Biol.Chem. 1977. Vol.252. P.1633-1638.
- Fersht A.R.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.293-295.
- Lucas E.C., Caplow M., Bush K.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1973. Vol.95. P. 2670-2673.
- O'Leary M.H., Klutz M.D.// Ibid. 1970. Vol.92. P.6089-6090.
- O'Leary M.H., Klutz M.D.// Ibid. 1972. Vol.94. P.3585-3589.
- Wang C.-L., Trout C.M., Calvo K.C. et al.// Ibid. 1980. Vol.102. P. 1221-1223.
- Mishra A.K., Klapper M.H.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P.7328-7336.
- Stein R.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1988. Vol.110. P.7907-7908.
- O'Leary M.H., Urberg M., Young A.P.// Biochemistry. 1974. Vol.13. P. 2077-2081.
- Inward P.W., Jencks W.P.// J.Biol.Chem. 1965. Vol.240. P.1986-1996.
- Zeeberg B., Caswell M., Caplow M.// J.Amer.Chem.Soc. 1973. Vol.95. P. 2734-2735.
- Zeeberg B., Caplow M.// J.Biol.Chem. 1973. Vol.248. P.5887-5891.

- Hess G.P., Seybert D., Lewis A. et al.// Science. 1975. Vol.189. P. 384-386.
- Kennedy W.P., Schultz R.M.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.349-356.
- Chen R., Gorenstein D.G., Kennedy W.P. et al.// Ibid. P.921-926.
- Schmidt P.G., Holladay M.W., Salturo F.G., Rich D.H.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1985. Vol.129. P.597-602.
- Christianson D.W., David P.R., Lipscomb W.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1987. Vol.84. P.1512-1515.
- Brady K., Liang T.-C., Abeles R.H.// Biochemistry. 1989. Vol.28. P. 9066-9070.
- Hunkapiller M.W., Forgas M.D., Richards J.H.// Ibid. 1976. Vol.15. P. 5581-5588.
- Balny C., Bleth J.G.// FEBS Lett. 1977. Vol.80. P.182-186.
- Fink A.L., Meehan P.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1979. Vol.76. P.1566-1569.
- Angelides K.J., Fink A.L.// Biochemistry. 1979. Vol.18. P.2363-2369.
- Markley J.L., Travers F., Balny C.// Europ.J.Biochem. 1981. Vol.120. P.477-485.
- Lehrmann G., Quinn D., Cordes E.H.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol.102. P.2491-2492.
- Malthouse J.P.G., Mackenzie N.E., Boyd A.S.F., Scott A.I. // Ibid. 1983. Vol.105. P.1685-1686.
- De Los De Tar P.// Ibid. 1981. Vol.103. P.107-110.
- Wells J.A., Cunningham B.C., Graycar T.P., Estelle D.A. // Philos. Trans.Royal Soc.London A. 1986. Vol.317. P.415-419.
- Sumi H., Ulstrup J.// Biochim. et biophys.acta. 1988. Vol.955. P.26-42.
- Bringar W.S., Chao T.L.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1975. Vol. 63. P.78-83.
- Polgar L.// Europ.J.Biochem. 1979. Vol.98. P.369-374.
- Александров С.Л., Антонов В.К.// Молекуляр.биология. 1987. Т.21. С. 147-158.
- Pastrez J., Houyet N.// Europ.J.Biochem. 1977. Vol.81. P.515-522.
- Petkov D.D.// Biochim. et biophys.acta. 1978. Vol.523. P.538-541.
- Grunwald E., Puar M.S.// J.Phys.Chem. 1967. Vol.71. P.1842-1845.
- Polgar L.// FEBS Lett. 1987. Vol.219. P.1-4
- Hangauer D.G., Monzingo A.F., Matthews B.W. // Biochemistry. 1984. Vol.23. P.5730-5741.
- Bünning P., Riordan J.F.// J.Inorg.Biochem. 1985. Vol.24. P.183-198.
- Hinkle P.M., Kirsch J.F.// Biochemistry. 1971. Vol.10. P.3700-3707.
- Nakamura T.// J.Biochem. 1979. Vol.86. P.751-755.
- Hubbard C.D., Kirsch J.F.// Biochemistry. 1970. Vol.11. P.2483-2490.
- Riddles P.W., de Jersey J., Zerner B.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1978. Vol.75. P.172-174.
- Adams P.A.// Biochem.J. 1980. Vol.191. P.653-655.
- Bender M.L., Brubacher L.J.// J.Amer.Chem.Soc. 1966. Vol.88. P.5880-5889.
- Mullen G.P., Dunlap R.B., Odum J.D.// Biochemistry. 1986. Vol.25. P. 5625-5632.
- Tonge P.J., Carey P.R.// Ibid. 1989. Vol.28. P.6701-6709.
- Phelps D.J., Schneider H., Carey P.R.// Ibid. 1981. Vol.20. P.3447-3454.
- Charney E., Bernhard S.A.// J.Amer.Chem.Soc. 1967. Vol.89. P.2726-2733.
- Brown W.E.// Biochemistry. 1975. Vol.14. P.5079-5084.
- Березин И.В., Мартинен К.// Биооргани.химия. 1975. Т.1. С.520-531.
- Vishni, Caplow M.// J.Amer.Chem.Soc. 1969. Vol.91. P.6754-6758.
- Stein R.L., Strimpter A.M.// Ibid. 1987. Vol.109. P.4387-4390.
- Volint M., Wang S.-P.// Arch.Biochem. and Biophys. 1978. Vol.187. P. 163-169.
- Tanizawa K., Kasaba Y., Kanaoka J.// J.Biochem. 1980. Vol.87. P.417-427.
- Nakayama H., Tanizawa K., Kanaoka J.// J.Amer.Chem.Soc. 1980. Vol. 102. P.3214-3218.
- Tonge P.J., Lee H., Sans Cartier L.R. et al.// Ibid. 1989. Vol.111. P.1496-1497.
- Carey P.R., Angus R.H., Lee H.-H., Storer A.C.// J.Biol.Chem. 1984. Vol.259. P.14357-14360.
- Pabert M., Petys M., Aavitskaar A.// Biochim. et biophys.acta. 1984. Vol.789. P.257-265.
- Catri M., Gerig J.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1983. Vol.105. P.4793-4800.

- Cairn M., Gerig J.T.// Ibid. 1984. Vol.106. P.3640-3643.
 Gerig J.T., Hammond S.J.// Ibid. P.8244-8251.
 Smolarek M.// Biochemistry. 1980. Vol.19. P.478-484.
 Knowles J.R.// Philos.Trans. Royal Soc. London.B. 1970. Vol.257. P. 135-146.
 Silver M.S., Stoddard M.// Biochemistry. 1972. Vol.11. P.191-200.
 Antonov V.K.// Symp.biol.hung. 1978. Vol.21. P.63-79.
 Bosshard H.R.// Experientia. 1976. Vol.32. P.949-963.
 Page M.I.// The chemistry of enzyme action/ Ed. M.I.Page. Amsterdam: Elsevier, 1984. P.1-54.
 Page M.I.// Enzyme mechanisms/ Ed. M.I.Page, A.Williams. L.: Royal Soc.Chem. 1987. P.1-13.
 Knowles J.R.// Science. 1987. Vol.236. P.1252-1258.
 Byers L.D.// J.Amer.Chem.Soc. 1977. Vol.99. P.4146-4149.
 Березин И.В., Мартинек К.// Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977. С.6.
 Page M.I.// Intern.J.Biochem. 1980. Vol.11. P.331-335.
 Koshland D.E., Neet K.E.// Annu.Rev.Biochem. 1968. Vol.37. P.359-410.
 Koshland D.E.// J.Cell.Comp.Physiol.Suppl.N1. 1956. Vol.47. P.217-232.
 Delist Ch., Crothers D.M.// Biopolymers. 1973. Vol.12. P.1689-1704.
 Westheimer F.H.// Adv.Enzymol. 1962. Vol.24. P.441-482.
 Reuben J.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1971. Vol.68. P.563-565.
 Marshall A.G.// Biochemistry. 1968. Vol.7. P.2450-2453.
 Gerig J.T.// J.Amer.Chem.Soc. 1968. Vol.90. P.2681-2686.
 Gerig J.T., Reinheimer J.D.// Ibid. 1970. Vol.92. P.3146-3150.
 Menger F.M., Venkataram U.V.// Ibid. 1985. Vol.107. P.4706-4709.
 Menger F.M.// Accounts Chem.Res. 1985. Vol.18. P.128-134.
 Dafforn A., Koshland D.E.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1971. Vol.68. P. 2463-2467.
 Storm D.R., Koshland D.E.// J.Amer.Chem.Soc. 1972. Vol.94. P.5805-5814.
 Storm D.R., Koshland D.E.// Ibid. P.5815-5825.
 Hoare D.G.// Nature. 1972. Vol.236. P.437-440.
 Brutice T.C., Brown A., Harris D.O.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1971. Vol.68. P.658-661.
 Brutice T.C.// Nature. 1972. Vol.237. P.335-336.
 Capon B.// J.Chem.Soc.B. 1971. Vol.6. P.1207-1209.
 Fort G.N.J., Richards W.G.// Nature. 1971. Vol.231. P.312-313.
 Jencks W.P., Page M.I.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1974. Vol. 57. P.887-892.
 Parker A.J.// Adv.Phys.Org.Chem. 1967. Vol.5. P.173-235.
 Dewar M.J.S., Storck D.M.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1985. Vol.82. P. 2225-2229.
 Madura J.D., Jorgensen W.L.// J.Amer.Chem.Soc. 1986. Vol.108. P.2517-2527.
 Alexander R., Parker A.J.// Ibid. 1967. Vol.89. P.5549-5551.
 Low P.S., Somero G.N.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1975. Vol.72. P.3305-3309.
 Low P.S.// Symp.biol.hung. 1978. Vol.21. P.217-247.
 Loftfield R.B., Elgner E.A., Pastuszyn A. et al.// Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 1980. Vol.77. P.3374-3378.
 Хургин Ю.И., Росляков В.Я., Клячко-Гурвич А.Л., Бруева Т.П.// Биохимия. 1972. Т.37. С.485-492.
 Dunn B.M., Brutice T.C.// Adv.Enzymol. 1973. Vol.37. P.1-59.
 Warshel A.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1978. Vol.75. P.5250-5254.
 Meot-Ner M.// J.Amer.Chem.Soc. 1988. Vol.110. P.3075-3080.
 Warshel A., Sussman F., Hwang J.-K.// J.Mol.Biol. 1988. Vol.201. P. 139-159.
 Johannin G., Kellersohn N.// Biochem. and Biophys.Res.Comm. 1972. Vol.49. P.321-327.
 Krishtalik L.I.// Charge transfer reactions in electrochemical and chemical processes. N.Y.; L.: Consult.Bur., 1986.
 Krishtalik L.I.// Chemical physics of solvation./ Ed. R.R.Dogonadze, E.Kalman, A.A.Kerayshev, J.Ulstrup. Amsterdam: Elsevier, 1988. Vol. 3.
 Phillips D.C.// Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1967. Vol.57. P.484-495.
 Schindler M., Assaf Y., Sharon N., Chitman D.M.// Biochemistry. 1977. Vol.16. P.423-431.
 Lourten R., Linn T.// Ibid. 1967. Vol.6. P.2281-2293.
 Williams R.J.P.// Protides Biol. Fluids.: Proc.Colloq.Bruges/ Ed. H. Peeters. Amsterdam: Elsevier, 1966. Vol.14. P.25-30.

- Vallee B.L., Williams R.J.P. // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1968. Vol.59. P.498-505.
- Kurz L.C., Ackerman J.J.H., Drysdale G.R. // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P.452-457.
- Kurz L.C., Drysdale G.R. // *Ibid*. 1987. Vol.26. P.2623-2627.
- Belasco J.G., Knowles J.R. // *Ibid*. 1983. Vol.22. P.122-129.
- Belasco J.G., Knowles J.R. // *Ibid*. 1980. Vol.19. P.472-477.
- Волькенштейн М.В., Догнадзе Р.Р., Мадумаров А.К. и др. // *Молекуляр. биология*. 1972. Т.6. С.431-439.
- Толман Г. // *ЖРХО.Сеп.хим*. 1892. Т.24. С.698-718.
- Fischer E., Abderhalden E. // *Ztschr.physiol.Chem*. 1902. Vol.36. P. 276.
- Bergmann M., Fruton J.S. // *Adv.Enzymol*. 1941. Vol.1. P.63-98.
- Ogston A.G. // *Nature*. 1948. Vol.162. P.963-965.
- Bernhard S.A., Gutfreund H. // *Proc.Intern. Symp. Enzyme Chem.*, Tokyo-Kyoto, 1958. P.124.
- Spencer T., Sturtevant J.M. // *J.Amer.Chem.Soc*. 1959. Vol.81. P.1874-1882.
- Hein G.E., Nienmann C. // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1961. Vol.47. P.1341-1350.
- Nienmann C. // *Science*. 1964. Vol.143. P.1287-1296.
- Hamilton C.L., Nienmann C., Hammond G.S. // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1966. Vol.55. P.664-669.
- Ingles D.W., Knowles J.R. // *Biochem.J*. 1967. Vol.104. P.369-377.
- Koshland D.E. // *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*. 1958. Vol.44. P.98-102.
- Hershiag D. // *Biorg.Chem*. 1988. Vol.16. P.62-96.
- Koshland D.E., Nemethy G., Filmer D. // *Biochemistry*. 1966. Vol.5. P. 365-385.
- Fersht A.R., Leatherbarrow R.J., Wells T.N.C. // *TIBS*. 1986. Vol.11. P.321-325.
- Borgford T.J., Gray T.E., Brand N.J., Fersht A.R. // *Biochemistry*. 1987. Vol.26. P.7246-7250.
- Fersht A.R. // *Ibid*. P.8031-8041.
- Березин И.В., Мартинек К. // *Структура и функции активных центров ферментов*. М.: Наука, 1974. С.5-21.
- Войтук А.А. // *Молекуляр.биология*. 1987. Т.21. С.1671-1676.
- Blow D.M. // *Accounts Chem.Res*. 1976. Vol.9. P.145-152.
- Campbell P., Nashed N.T. // *Biorg.Chem*. 1978. Vol.7. P.69-76.
- Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Т. // *Курс химической кинетики*. М.: Высшая школа, 1969. С.61.
- Чернавский Д.С., Хургин Ю.И., Шноль С.Э. // *Молекуляр.биология*. 1967. Т.1. С.419-424.
- Fröhlich M. // *Nature*. 1970. Vol.228. P.1093-1097.
- Блюменфельд Л.А. // *Биофизика*. 1971. Т.16. С.724-727.
- Блюменфельд Л.А. // *Там же*. 1972. Т.17. С.954-956.
- Сидоренко Н.П. // *Там же*. С.907-908.
- Averbukh I.S., Blumenfeld L.A., Kovarsky V.A., Perelman N.F. // *Biochim. et biophys.acta*. 1986. Vol.873. P.290-296.
- Беловолова Л.В., Блюменфельд Л.А., Бурбаев Д.Ш., Ванин А.Ф. // *Молекуляр.биология*. 1975. Т.9. С.934-940.
- Stackhouse J., Nambiar K.P., Burlant J.J. et al. // *J.Amer.Chem.Soc*. 1985. Vol.107. P.2757-2763.
- Шноль С.Э. // *Колебательные процессы в биологических и химических системах*. М.: Наука, 1967. С.22.
- Marcus R.A. // *Annu. Rev.Phys.Chem*. 1964. Vol.15. P.155-180.
- Догнадзе Р.Р., Кузнецов А.М. // *Итоги науки. Электрохимия*. М.: ВИНТИ, 1969.
- Волькенштейн М.В., Догнадзе Р.Р., Мадумаров А.К., Харкац Ю.И. // *ДАН СССР*. 1971. Т.199. С.124-127.
- Левич В.Г., Мадумаров А.К., Харкац Ю.И. // *Там же*. 1972. Т.203. С. 1351-1353.
- Кристаллик Л.И. // *Там же*. Т.205. С.469-472.
- Кристаллик Л.И. // *Молекуляр.биология*. 1979. Т.13. С.577-581.
- Кристаллик Л.И. // *Там же*. 1981. Т.15. С.290-297.
- Volkenstein M.V. // *J.Theor.Biol*. 1972. Vol.34. P.193-195.
- Albery W.L., Knowles J.R. // *Biochemistry*. 1976. Vol.15. P.5631-5640.
- Christensen H., Martin M.T., Waley S.G. // *Biochem.J*. 1990. Vol.226. P. 853-861.
- Tian G. // *Ibid*. 1987. Vol.248. P.619-620.
- Карпейский М.Я., Яковлев Г.И., Антонов В.К. // *Биоорганич. химия*. 1980. Т.6. С.645-654.
- Ivanov V.I., Korpetsky M.Ya. // *Adv.Enzymol*. 1969. Vol.32. P.21-53.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсолютных скоростей реакций, теория 108, 363
 Аваморин 54
 Автолиз 204, 267-268
 — ускорение 268
 S-аденозилметионин 343
 Адипсин 45
 Азокрасители, *цис-транс*-изомерия 356
 Аквализин I 42, 209
 Акрифлавин 242
 Акрозин 41
 — активация предшественника 209
 — активация Ca^{2+} 221
 — ингибирование 255
 Активатор плазмидогена 44
 — тканевый 44
 Активации энергия, роль заряда 356
 Активационные параметры ферментативного гидролиза 230
 Активационный фактор X 52, 208
 Активация амидгидролаз 265-266
 — — анионами 216
 — — ионами Ca^{2+} 221
 — — механизм 265
 Активный центр, определение понятия 85
 — — микросреда 272
 — — сравнение 94-95
 — — топография 264
 Активированный комплекс 108
 Актинидин 51
 — активный центр 89
 — значения pK_a групп активного центра 306
 — каталитические свойства, отличие от папаина 295
 — последовательность аминокислот 67
 — третичная структура 74, 78
 — эстеразная и амидазная активность 161
 Актиномицеты 257
 Аланин 164
 N^2 - β -аланил-аргининдипептидаза 58
 Аланинкарбоксипептидазы, почвенных микроорганизмов 59
 — микробные 59
 D-аланинкарбоксипептидазы, микробные сериновые 39
 — — активный центр 86
 — — ацилфермент 313
 — — ингибирование пенициллинами 254
 — — транспептидация 202
 — — третичная структура 78
 — металлосодержащая *Streptomyces albus* G 59
 Алеураин ячменя 52
 Алкил(арил)амидазы 36
 Алкилборные кислоты 261-264
 Алкилфосфаты 248
 Алкоголиз амидов 120, 123
 Алкогольдегидрогеназа 31
 Аллостерические эффекторы 266-267
 Альбумин сывороточный 357
 Альдегиды природные 263
 Альдолаза дрожжевая 357
 Альтернативная C3/05 конвертаза 46
 Амастатин 255
 Амидаза *Pseudomonas aeruginosa*, ингибирование 254
 — — эстеразная и амидазная активность 161
 Амидазы алифатические микроорганизмов 64
 — классификация 36
 — расщепляющие циклические амиды 65
 — специфичность 165
 — тип расщепляемой связи 10
 Амидгидролазы, влияние на активность, ионов 220-224
 — — — pH 212-220
 — — — конститутивных 221
 — — — растворителей 224-225
 — — — температуры 227-235
 — источники, искусственные 37
 — классификация 36, 163
 — комплексы с Ca^{2+} 221
 — с ингибиторами, кристаллография 288
 — криоэнзимология 235-236
 — модели 138-140
 — модификация, типы 195
 — небелковые составляющие 71
 — определение активности 146-149
 — природные мутантные формы 198
 — простетические группы 221
 — распространение 36-37
 — синтетическая активность 200-201
 — температурная устойчивость 233-235
 — третичная структура 73-84
 — характеристика типов 37, 63-65
 5-Амидиноиндол, ингибирование трипсиноподобных ферментов 240
 n-Амидофенилпиридиноградная кислота 285
 Амидины 242
 Амидная группа, внеплоскостная деформация 13-14, 288
 — — водородные связи, термодинамические параметры 19-20
 — — геометрия 11-16, 34
 — — гибридизация 18
 — — O-атома 18
 — — диамагнитная анизотропия 22
 — — значение pK_a 19

- инверсия конфигурации 14
- кислотная диссоциация 19
- лабильность 34
- β -лактамов 23
- непептидные 22-23
- номенклатура 11
- пирамидализация атома азота, инверсия конфигурации 14
 - -- карбонильного углерода, *син-* и *анти-*формации 14
 - -- -- направление и величина 14,125
 - -- передача электронного эффекта 22
 - -- -- порядки связей 17
 - -- распределение зарядов 17
 - -- резонансная дестабилизация 311
 - -- -- модель 12
 - -- резонансные формы 11,18
 - -- -- суперпозиция 12
 - -- свойства 18-22
 - -- -- амидимидольная таутомерия 22
 - -- -- силовые постоянные 17
 - -- устойчивость 34
 - -- *цис-транс*-переходы 11,16
 - -- -- активационные параметры 15-16
 - -- *цис*-форма 29
 - -- электронная структура 16-18,34
 - -- электронные эффекты заместителей 22
 - -- связь, гидролиз полиэлектролитами 138-139
 - -- внеплоскостная деформация 288
 - -- -- субстрата в участках вторичной специфичности 287
 - -- резонансный гибрид 13
- Амиды, карбоновых кислот 10
 - катализ ионами металлов 127
 - нуклеофильный 133
 - комплексы с металлами 21
 - резонансно дестабилизированные 105
 - тиоллиз 123
 - электронная структура 16-18
- Аминоацилаза почек свиньи 52,317
- Аминоацилальдегиды, "аналоги переходных состояний" 263
- Аминоацилгистидиндипептидаза 57-58
- Аминоацилметилгистидиндипептидаза 58
- Аминоациллизиндипептидаза 58
- 5-Аминовалериламидаза 53
- Аминокапролактан 65
- Аминокислотные остатки, боковых цепей типа 25
 - гидрофобность 26
 - значения pK_a 26
 - маскирование 32
- Аминокислоты Т-защитные, нитрофениловые эфиры 147
- Аминолиз, сложных эфиров 121,122
- Аминолиз 122
- Аминопептидаза А 56
 - ингибирование 255
 - специфичность вторичная 167
 - первичная 165
 - В 49
 - ингибирование 255
 - Со дрожжевая 57
 - М(N) 56
 - Р ворсинок почечных канальцев, небелковые составляющие 73
 - -- тканей позвоночных 57
 - -- *Escherichia coli* 57
 - W 58
- Аминопептидаза цитозольная 56
- Аминопептидазы, ингибирование 262
 - классификация 36,164
 - микросные 56,57
 - специфичность 164
 - тканей позвоночных 49,56-58,64,73
 - цистеиновые 49
- Аминоэндопептидаза 52
- "Аминоперенос" 201
- "Аминофермент" 244,314,316
- "Аналоги переходных состояний" 263
- Анафин 50
- Ангидротрипсин 260,276
- Ангитензин II, ферментативный синтез 201
- Ангитензинназа С 39
- Ангитензиноген 166,172
 - видовая вторичная специфичность гидролиза 170
- Ангитензин-превращающий фермент 58
 - действие на защищенные олигопептиды 163
 - -- ион хлора как аллостерический эффектор 267
 - -- ингибирование 247
 - -- сравнение с термолизинем и карбоксипептидазой 92-94
- "Анкорд" 44
- Анилиды кислот 100,120
- Антипаин 255
 - "аналог переходного состояния" 263
- Антиплазмин 257
- Антистазин 257
- Антитела, протеслитическая активность 97
- α_1 -Антитрипсин, ингибиторные свойства 257
- Антитромбин 257,259
- α_1 -Антихомотрипсин 257
- Аргининаминопептидазы 49
- Аргининкарбоксипептидаза 59
- Арфаменин 255
- Аскамингидролизующая амидаза *Xanthomonas citri* 53
- Аспарагин 10
- Аспарагиназы 48,317
 - тип расщепляемой связи 10
 - влияние D₂O 226
 - ингибирование 261
 - стереоспецифичность 189
- Аспарагинилсахариды, субстраты протеаз 10
- Аспартатаминопептидаза почек позвоночных 56-57
 - сыворотки крови 56
- Аспартаткарбоксипептидаза 59
- Аспартатные амидгидролазы 53-56
 - активационный пептид, отщепление 210
 - -- активные центры 90-92
 - -- -- компланарность карбоксильных групп 310
 - -- -- симметрия карбоксильных групп 306,310
 - -- -- сходство с системой дикарбоновых кислот 310
 - -- -- титрование 148
 - -- группоспецифические ингибиторы 250-251
 - -- ингибирование 247

- каталитические группы 304
- локализация молекулы воды 296
- нечувствительные к пепстатину 63
- первичная структура 69-71
- -- -- гомология 70
- структура комплексов 284, 295-298
- третичная структура 74, 80-82
- Аспаратные протеиназы 36
 - значения pK_a групп активного центра 219
 - ингибирование 256
 - комплексы, кристаллография 295-298
 - -- -- ориентация карбоксильной группы расщепляемой связи 296
 - микроорганизмов 54-55
 - значения pK_a групп активного центра 219
 - растений 55
 - ретровирусов 56
 - специфичность 297
 - третичная структура 74, 80-82
 - *Endothia parasitica*, см. также Эндотиапеписин
 - *Penicillium jathinellum*, см. также Пенициллопепсин
 - *Rhizopus glenensis*, см. также Ризопуспепсин
- β -аспартилдипептидаза, животных 49
- Escherichia coli* 49
- β -аспартилдипептидазы 49
- Аспартилфенилаланин дипептидаза 58
- Аспергиллопептидаза, аспаратная 54
- Аспергиллопептидаза сериновая В 41-42
 - С 42
- Аспирин, гидролиз 132
- Ассоциация ферментов 156-157
- Атом-атомных потенциалов метод 28, 29, 96, 123, 281, 286
- АТР-зависимый протеолиз 64
- Аутопроцессинг 173
- Ацетамид 17
 - гидролиз амидазой 165
- Ацетилглутаматдеацилазы микробные 53
- N-ацетилглюкозамин 10
- Ацетилмидазол, механизм гидролиза 128-129
- Ацетилмурамоилаланинкарбоксипептидаза 59
- D-ацетиламиноацилхимотрипсин 362
- N-ацетилпролинамидогидролаза *Pseudomonas* sp. 62
- N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсин 333
- Ацетилхимотрипсин 333
- Ацетилтаноламиндеацилаза печени 53
- Ацетон 17
- Ациламинокислота-отщепляющий фермент тканей позвоночных 39
- Ацилаза I 52
- Ациламиногруппа в субстратах 181-183
- Ациламинокислоты 10
- Ацилкарбазаты 162
- Ацилмоносахариды 200
- 5-ацилоксиоксазолы 252
- Ацилпапайны 333
- Ацилферменты 95, 312, 332-340
 - дисторсия 288
 - резонансные Раман-спектры 334
- Ацилхимотрипсины 336
 - дисторсия эфирной группы 333
 - связь между скоростью деацилирования и поляризацией карбоксильной группы 334
 - селеносодержащие 334
 - Ацильный перенос 201
- "Барьерная" протеиназа 55
- "Батрахобин" 44
- Бациллопептидаза F 42
- Белки аномальные, деградация в ретикулоцитах 64, 173
 - узнавание 173
- Биосинтез 31
- вирусные, "нарезание" 173
- Са-связывающие 69
- денатурация 33
- динамическая подвижность 281
- значения ϕ и ψ 28, 288
- нативные, устойчивость к протеолизу 170
- предсказание из анализа первичной последовательности 30
- противоречия в гомологии 30-31
- распределение остатков тирозина и триптофана 32
- типы вторичной структуры 30-31
- "созревание" предшественников 207
- структурные 48
- субстраты протеаз 29-33
- типы вторичной структуры 30-31
- третичная структура 30
- Белковая инженерия ферментов 198
- Белковые ингибиторы, активные центры 259
 - комплексы с протеазами 288
- Белок APF-1 64
 - С 43
 - ингибирование 257
- Бензамидин, комплекс 283
- Бензилоксикарбонил-L-фенилаланин 301
- 2-бензил-4-оксо-5,5-трифторпента-новая кислота 300
- Бензилпенициллин, геометрия 23
 - гидролиз β -лактамазой 166, 193
- Бензилсукцинат 244
- β -бензим 139
 - сравнение с химотрипсином 140
- N-бензоилпиридин 20
- Бензоксазины 252
- Бессеребряная фотография 189
- Бестатин 255
- Бетаина эфир, гидролиз 126
- Бойера метод 153-154
- Борные кислоты, аналоги неспецифических субстратов 262
 - -- тетраэдрических промежуточных соединений 292
- Блеомцингидролаза 49
- Брадикинин, вторичная специфичность гидролиза 170
 - [дез-Pro³]
- Бриггса-Холдена кинетика 216
- Бриллиантовый зеленый 242
- α -бромацетамиды 249
- Бромелаин 50, 63, 67
 - влияние pH 218
 - дитиоацилфермент, Раман-спектры 295
- каталитические свойства, отличие от папайна 295

- небелковые составляющие 71
- определение 148
- первичная структура 70
- 6- β -Бромпенициллановая кислота 254
- 1,4-Бутандиол 313
- В-цепь инсулина, расщепление протеазами 160
- δ -Валеролактан 20
- Ван-дер-ваальсова оболочка 285
- Вероятность расщепления 176, 194
- Видоспецифичность ренина 170
- Витамин К 208
- Взаимодействия "ближние" 27
 - гидрофобные 271–272
 - дисперсионные 270–271
 - ионные, оценка направленным мутагенезом 273
 - фермент-субстратные, строго специфические 34
 - типы 371
 - электростатические 273
 - вклад вторичных взаимодействий 280
 - энергия 270
 - – – полная 366
 - Н- π 29
 - π - π 29, 80, 273
- Виральные протеиназы 37
- полипротеины, процессинг 172
- Включение ^{18}O в субстрат 324
 - – при транспептидации 314
- Внеплоскостная деформация амидной группы 13–15, 288
- "Внутренний" комплекс 372
- Внутриклеточная протеиназа 41
- Внутримолекулярная подвижность белков 32
- Вода, дипольный момент 33
 - как "мостик" электростатических взаимодействий 273
 - константы ионизации 3
 - структура и свойства 33–34
 - "субстрат" амидгидролаз 33
 - трехмерная сетка водородных связей 33
- Водородная связь 19–21, 272
 - – амидного протона с ароматическим кольцом 21
 - – направление 20
 - – незаряженная, вклад в энергию комплексообразования 272
 - – в переходном состоянии 114
- Вторичная специфичность 158, 185, 278 375
- "Выброс" продукта 147
- Высокомолекулярная протеаза эритроцитов 61
- Вязкость, зависимость от температуры 275
 - влияние на гидролиз 193
- Габоназа 47
- Галактозилтрансфераза 48
- Галактокиназа 140
- Галоидкетоны 86
 - реакция с γ -химотрипсином 87
- Галоидметилкетоны, механизм ингибирования 249
- Галоиденоллактамы 253
- Гаммета константы, основность амидов 19
- Ганча коэффициенты гидрофобности 26, 271
- Гастриксин 53, 164
 - ингибирование 255
- Гексокиназа дрожжевая 173
- Гематин 194
- Гемиацетали 288
- Гемикетали 263
- Гемитиоацетали 288
- Гемитиокетали 263
- Гемоглобин 148, 365
 - период полураспада 6
- Гемоглобингидролизующая протеиназа печени 51
- Гены, интрон-экзонная структура 65
- Гепсин 47
- Гибридизация в амидной группе 311
- Гидразиды, расщепление амидгидролазами 163
- Гидролаза Н 52
- Гидролиз амидов, влияние среды 106
 - – катализ OH^- и H_3O^+ ионами 101
 - – кинетика 101–102
 - – термодинамика 98–101
 - пептидов, калориметрия 101
- Гидроксаматы, расщепление амидгидролазами 163
- Гидрофобность аминокислот 25
 - индексы, аддитивность 27
 - количественная мера 25
 - пептидов 25–29
 - субстратов 190
- "Гидрофобный карман" 289, 298
- Гиподермин А 43
 - В 43
- Гипотеза "захвата" 260
 - "пространственно-временная" 353
- Гирудин 257
- Гистонспецифическая протеаза 61
- Глиальные клетки 257
- Гликозилфосфатидилинозит 71
- Гликопептидазы 64
- Глицинкарбоксипептидаза 59
- Глицилтирозин, комплекс с карбоксипептидазой А 278, 298, 299
- α -глутамилглутаматдипептидаза 58
- γ -глутамилгидролаза 51
- γ -глутамилдипептидаза 58
- γ -глутамилтранспептидаза 55
- Глутамин 10
- Глутаминаза почек свиньи, аллостерическая активация 223, 267
 - влияние D_2O 226
 - тип расщепляемой связи 10
- Глутамин (аспарагин)аза 56
- Глутаминилпептидглутаминаза *Bacillus circulans* 53
- Глюкоза 173
- 4-N-(2- β -D-глюкозаминил)-L-аспарагиназа 62
- Гомокарнозиназа 58
- Гофмейстера, лиотропный ряд 224
- Графов теория 144
- Гранзимы лимфоцитов А, В(Г, Н), D, Е, F 45
- Группоспецифические необратимые ингибиторы 247–252

- Давление, влияние на ферментативную реакцию 228
 Двухсубстратных реакций, кинетика 144
 Дегидроаланин 89
 Дегидрогеназы 302
 Дегидропептидаза II 53
 Дез- α -фибриноген 172
 Денатураза 170
 Денатурация 33, 225, 233-232
 - тепловая 197
 Депсипептиды 23
 Десметиленстатин (Dst) 254
 Десольватация, влияние на энтропию 280
 Деформация C-C связи 354
 - субстрата 356-357, 363-364
 - фермента 364
 Диазоацетилнорадреналин, метиловый эфир 251
 Диазокетоны 63, 90
 Диазометилкетоны 249-250
 Диазооксонорадреналин 63
 4,8-Диамино-3-оксиктановая кислота 285
 1,3-Дибромацетон 250
 Дивергентная эволюция 67
 3,4-дигидро-2-оксо-1,4-этаноксинолин 105
 Диеновая конденсация 352
 Диизопропилфторфосфат 37, 85, 140, 212
 2,6-Дикарбоксибензойной кислоты метиловый эфир 132
 Дикарбоновые кислоты, конформационно закрепленные 310
 Дикетоморфолин, гидролиз 162
 Дикетопиперазины 162
 Диксона метод 237
 2,3-диметилмалеамовая кислота 132
 N,N-диметилацетамид 20
 N,N-диметилтрихлорацетамид 20
 N,N-диметилформамид 20
 N,N-дифенилацетамид 20
 N,N-диметилхлорацетамид 20
 Диметилформамидаза *Pseudomonas* sp. 62
 2,2-Диметилхинуclidон, гидролиз 105
 Динамическое концентрирование 353
 2,6-Диоксибензойной кислоты метиловый эфир 134
 2,5-диоксопиперазин, субстраты протеаз 10
 Динорфин 48
 Динорфинпревращающий фермент мозга 51
 Диоксопиперазины, субстраты амидаз 65
 Дипептидаза поджелудочной железы человека 58
 - M 58
 Дипептидазы 36
 - микросомальные 58
 - специфичность абсолютная 164
 Дипептидилкарбоксипептидаза II *Escherichia coli* 58
 - - - - ингибирование 247
 - - - - конформационная чувствительность 170
 Дипептидилкарбоксипептидазы I тканей позвоночных 58
 - в α , β -элиминировании 204
 - ингибирование 255, 258
 - комплексобразование 319
 - распад тетраэдрических промежуточных соединений 332
 - сравнение с термолизином 92-93
 - эстеразная активность 161
 Дипептидилпептидаза II гипофиза быка 38
 - - эпидермиса хряка 38
 - - *Flavobacterium meningosepticum* 38
 - - *Sacharomyces cerevisiae* 38
 - - *Xenopus laevis* 38
 - III хрусталика человека 38
 - мозга крыс 38
 - IV печени свиньи 38
 - - почек 38
 - - разных тканей позвоночных 38
 - - фибробластов человека 38
 Дипептидилпептидазы 36
 - сериновые 38
 - I, V цистеиновые 49
 Дисторсионный механизм 356
 Дитиотриетол 268
 Дитиоэритритол 268
 Дифенилдиазометан 250
 Дифференциальное связывание 372
 Диффузионный контроль ферментативной реакции 193
 Диэлектрическая проницаемость 224
 - - микрогетерогенность у ферментов 356
 Диэтилтерефталат 24
 ДНК 66
 - рекомбинантные 37
 ДНКазы, ограниченный протеолиз 170
 Домены 31, 81, 171
 Дупликация гена 69, 80
 "Дыбы" теория 363
 Е-64 255, 285, 292
 Е-64с 255, 285, 292
 Енолизация кетонов 204
 Желатиназа аспартазная 53
 - металлосодержащая 61
 Зависимость от pH, кинетика 213-218
 α -Замещенные ациламинокислоты 162
 Заряды на атомах амидов 17
 - - - сложных эфиров 25
 Зимогены 37, 69
 - активация 171, 206-212
 - активность 195
 Значения pK_a групп активных центров 218-220
 - - - - аспартазных протеаз 219
 "Идеальный" фермент 371-372
 Иди-Хофсти метод 145
 Изокумарины 253
 Изотопный обмен кислорода 111
 - - - кинетика 112-113, 314-317
 - - протонов в белках 96
 - эффект 107, 225-227
 Изоцианаты 254
 Исоцитратдегидрогеназа 47
 ИК-спектроскопия, определение pK_a 220
 Имидазол, катализ внутримолекулярный 133
 - таутомеры π и τ 309

- 2-Имидазолилбензойной кислоты метиловый эфир 133
 Имидазолий-катион, стабилизация 133
 Имидазольные группы в антителах 97
 α -[2-аминогексагидро-4-пиримидил]-глицин (Pg1) 254
 Имобилизация 235
 Имобилизованные ферменты, синтетическая активность 200
 Иммуноглобулин А протеаза *Streptomyces* sp. 61
 C3b-инактиватор 46
 "Ингенсин" 47,63
 Ингибирование, ароматическими соединениями 241
 — анализ векторной системой координат 239
 — амидинами 242
 — красителями 242
 — кинетика 237-240
 — необратимое 240
 — продуктом 238-239
 — хелатирующими агентами 242-243
 α_1 -ингибитор 257
 C1-ингибитор 259,278
 "Ингибитор А" 60
 Ингибитор активатора плазминогена *Escherichia coli* 258
 — гельминтов *Ascaris* 258
 — — связывание карбоксипептидазой А 260
 — карбоксипептидазы А из картофеля 260,285
 — металлопротеиназ тканевый 258
 — субтилизина *Streptomyces* sp. 258
 — термоллизина *Streptomyces* 258
 — C1-фактора компонента 257
 Ингибиторы, "аналоги переходного состояния" 260-264,328
 — белковые аспартатных протеаз 258-259
 — — консервативные участки 259
 — — металлосодержащих протеаз 258-259
 — — роль десольватации при комплексообразовании 280
 — субстратоподобные 259-260
 — трипсиновые панкреатические Куница 257
 — — комплекс, кристаллография 285, 287
 — — полусинтетические 258
 — — секреторные Казала 257
 — — комплекс, кристаллография 285
 — — цистеиновых протеаз 258
 — группоспецифические, необратимые 247-252,256
 — микробные 254-256
 — неспецифические 240-243
 — "синкаталитические" 252-254
 — специфические 243-247
 — субтилизинные 257
 — титрование активных центров 146, 147
 Индексы специфичности 174-176
 Индивидуальные кинетические константы 152-154
 — — стадийное изменение значений pK_a 216-217
 Индолилакрилоилхимо трипсин 302, 333-335
 Индуктивный эффект 103
 Индуцированное соответствие 364-365
 Инсулин человека, частичный синтез 201
 Инсулиназа 52
 Интроны 65
 Ионная сила 223-224
 Ионы металлов, комплексы с краун-эфирами 139
 Искусственные ферменты 197
 — катализаторы 139
 Йодацетамид 89
 Йодацетат 63,89
 К-67
 κ -казеин, гидролиз химозином 171-172
 Казеин, комплексы с полиэлектролитами 138
 — гидролиз химозином 171
 Калликреин А 44-45
 — комплекс, кристаллография 283,309
 — смена лимитирующей скорость стадии 220
 — сравнение с химотрипсином, трипсином и эластазой 77
 — glandулярный, ингибирование 45,243
 Калликреины плазмы 44
 — ингибирование 245
 — определение 148
 — протеолиз проренина 211
 — реакция с галлоидкетонами 248
 — смена лимитирующей скорость стадии 220
 Калориметрия 230,231
 Калотрепины латекса *Calotropis gigantea* 50
 Калпаины I,II,III тканей позвоночных 51
 — автолиз 222
 — активация Ca^{2+} 221-222
 — активный центр 89
 — — ингибирование 222
 — ингибирование 258
 — репрессии-дерепрессии механизм 222
 — протеолиз 193
 — — расщепление профермента 209
 — — — автокаталитическое 209
 — специфичность 164
 — структура 69
 — — субъединичная 221
 "Кальдолизин" 60
 Кальмодулин 69,222
 ϵ -капролактан 20
 Капроприл 247
 Карбаматы 253
 Карбены 90,251
 γ -карбоксиглутаминовая кислота 173,208
 Карбоксилат-ионы, каталитическая роль 133
 Карбоксильная группа, анти-конформация 1 катализе 133
 Карбоксипептидаза А 58-59
 — — азосочетание 282
 — — активация субстратом 265
 — — активационные параметры катализа 230
 — — активный центр 92-94
 — — арсанилпроизводные 297
 — — ацетилирование 243
 — — в кристалле и в растворе 96

- влияние D_2O 226
- гидролиз карбаматных и карбонатных связей 162
- енолизации 204
- -- стабильность 301
- замена Zn^{2+} на Co^{2+} 197
- значения pK_a активного центра 219, 305
- ингибирование 243, 244
- -- ионами 224
- -- микробными ингибиторами 255
- -- белковыми ингибиторами 258
- катализ обмена ^{18}O 203
- -- общий основной 317
- -- криоэнзимология 235, 317
- -- комплексообразование 278, 338
- -- координация с металлом 319
- -- комплексы, кристаллография 284, 298-302
- -- с фосфонамидатами 300
- -- механизм катализа 300, 344
- -- переноса протона 332
- -- модификация, амидазная активность 197, 317
- -- нуклеофильность воды 319
- -- остатки Tyr и Trp 32
- -- первичная структура 71, 72
- -- распад тетраэдрических промежуточных соединений 332
- -- связь K_m и k_{cat} 190
- -- специфичность 167
- -- субстратсвязывающие центры 297
- -- субстраты, кетоаналоги 300
- -- третичная структура 74, 82-84
- -- формы α, β, γ 71
- -- в α, β -элиминировании 204
- -- вестеразная активность 161
- -- эффективность 192
- Co^{+3} -карбоксипептидаза А, координация с металлом 319
- В 59
- аллостерическая активация 266
- в кристалле и в растворе 96
- ингибирование 244
- специфичность 167
- третичная структура 74, 82
- G цистеиновая 51
- H(E) мозга 59
- I микробные 59
- M плаценты 59
- N плазмы крови 59
- ингибирование 244
- Р тканей позвоночных и беспозвоночных 59
- S 59 *Streptomyces cerevisiae*
- T *Thermoactinomyces* sp. 59
- Y 38, 162
- значения pK_a активного центра 219
- -- конформационные изменения 218
- -- первичная структура 71, 72
- -- роль углеводов 197, 198
- -- синтетическая активность 200
- -- специфичность, гидролиз изопептидных связей 163
- -- вестеразная активность 161, 162
- -- W, сериновая 162
- Карбоксипептидазы 36
- беспозвоночных 59
- металлосодержащие 58-59
- сериновые лизосом позвоночных 38
- специфичность 164
- -- микробные 38
- -- растений 38
- -- предшественники 209
- N-карбоксифенилаланин (Cph) 254
- Карбониевые ионы 253
- "Карнозиназа" 57
- Карта альтернативных путей 107, 110
- Каскадные процессы 6, 208
- Каталаза 194
- Катализ внутримолекулярный 130-137
- ионами металлов 133
- -- роль энтропийных факторов 135-136
- -- эффективность 136
- -- гидролиза амидов 115, 116-140
- -- классификация 116-117
- -- гидроксильной группой 119-122
- -- имидазолом 128-130
- -- ионами металлов 126-128
- -- карбоксильной группой 124-126
- -- в *син*- и *анти*-конформации 125
- -- карбоновых кислот производных, кислотный 114
- -- механизм 133
- -- мицеллярный 137-138
- -- "мультипротонный" 308
- -- полифункциональный 130-137
- -- эффективность 136-137
- -- тиоловой группой 122-123
- Катализаторы полимерные 138
- Каталитическая эффективность 117-119, 366
- "триада" 309
- Каталитически активные группы 304-305
- -- значения pK_a 305-306
- -- антитела 97
- Каталитический участок 85
- Катепсин А 38
- ингибирование 255
- В(B1) 50, 63
- -- активный центр 89, 306
- -- ингибирование 250, 255, 258
- -- первичная структура 67, 70
- -- -- гомология с папаином 69
- -- расщепление В-цепи инсулина 160
- -- специфичность позиционная 163
- B2 50
- C 49
- -- аллостерическая активация 267
- D тканей позвоночных 53-54, 64
- -- активация, АТФ-зависимая 210, 266
- -- ингибирование 245, 255, 258
- -- селезенки быка, расщепление В-цепи инсулина 160
- -- специфичность вторичная 167
- -- титрование активных центров 148
- -- вриптоцитов, расщепление В-цепи инсулина 160
- E нейтрофилов 54, 63
- G 43
- -- активация 209
- -- ингибирование 252, 257
- -- реакция с хлоркетонами 248
- -- специфичность первичная 166
- -- H, цистеиновый 51, 63
- -- -- активный центр 306
- -- -- гомология с папаином 69

- — — ингибирование 258
- — — специфичность позиционная 163
- J-тканей человека 51
- K 52
- L печени сериновый 51
- — лизосомальный цистеиновый 63, 89
- — ингибирование 255, 258
- — расщепление В-цепи инсулина 160
- N плаценты 51
- R 46
- S селезенки 51
- T почек 51
- Катепсин D-подобные протеиназы тканей позвоночных 54
- Квасисубстраты 8, 283
- Квантово-химические методы 28, 123
- — в расчете модели аспарататных протеаз 306
- — — — переноса протона 329
- — — — энергии белок-лигандного взаимодействия 280
- — эффекты 357–358, 371
- Кератин 65
- Кератиназа *Trichophyton mentagrophytes* 61
- γ-Кетокислоты 204
- Кинг-Альмана метод 144
- Кинетика Брингса-Холдена 142, 216
- Михаелиса-Ментен 142, 216
- — отклонения 155–157
- ферментативная 141–157
- — стационарная 141–144
- Кинетический изотопный эффект 114–115, 225–227, 325, 381
- ацилхимотрипсинов 335
- температурная зависимость 226–227, 358
- механизм ингибирования стандартный 259–260
- — — — отклонения 260
- Кинетические параметры, методы определения 144–149
- — смысл и значение 149–150
- Кинетическое pK_a 216, 381
- Кинетической эквивалентности принцип 117, 122
- Кининаза I 59
- Киноиногены 258
- Кислотно-основной катализ 116
- Кислотный гидролиз, нуклеофильная атака 110
- Классическая c3/c5 конвертаза 46
- Клострипсин 50
- активация Ca^{2+} 221
- влияние pH 218
- активный центр 89
- — — значение pK_a 219
- "Ключ-замок", концепция 359
- Ковалентный катализ 311 сл., 341
- Ковалентные промежуточные соединения, криоэнзимология 236
- "Коконоза" 40
- Коллагеназы 60–61
- беспозвоночных 85, 165
- ингибирование 247, 258
- клостридий
- микроорганизмов 60, 61
- первичная структура 68
- позвоночных 60–61
- предшественники 209
- расщепление В-цепи инсулина 160
- специфичность первичная 165
- Коллагенолитическая протеиназа гриба *Entomophthora coronata* 44
- — — — расщепление В-цепи инсулина 160
- Коллагенолитические протеиназы 44, 46
- Коллагенолитический катепсин 51
- Компенсационный эффект 232–233, 333
- Комплексообразование, кинетика 274–275
- двухстадийное, изомеризация 236
- конформационные изменения 281–282
- стадийность 275–276
- термодинамика 278–281
- Комплексы амидгидролаз, кристаллография 283–285
- металлов с H_2O 127
- с амидами мостиковые 21
- с переносом заряда 273
- фермент-продукт 332–340
- π-Комплексы 22
- Комплемента фактор 1 46
- — I альтернативной системы 46
- — C3 48
- Комплементарность 285, 366
- Конвергентная эволюция 67
- Конгруэнтная модель 191, 349–351, 366, 372
- Константа диссоциации 224
- каталитическая 142
- — зависимость от pH
- — — вязкости раствора 275
- — — давления 232
- кинетическая Ван-Слайка 151
- Михаелиса 142
- — связь с K_{cat} 189–190
- субстратная 142
- скорости, наблюдаемая 121
- — функция распределения 194
- Конформационные изменения 32, 96, 230, 273, 275–276, 365
- переходы, pH-зависимость 217–218, 267, 282
- Конформационная подвижность белков, влияние денатурации 32
- Конформационная специфичность 189
- Конформация аминокислот и пептидов 27–29
- боковые цепи 29
- влияние внешней среды 29
- — гидратации 29
- основная цепь 28–29
- номенклатура 27
- энтропийный вклад 28
- Конформационное состояние ферментов, влияние pH 220
- pH-зависимое 306
- "Конформон" 371
- Концентрационный эффект 352, 357
- Кооперативное связывание 155
- Корреляционные уравнения 104, 178, 180, 182
- Кошланда-Немети-Фильмера модель 365
- Коэффициент синхронизации 136, 323
- Хилла 156
- Краун-эфир 139
- Криоэнзимология 228, 235–236, 313, 326
- Креатин 10
- Кристаллическое поле 282

- "Кротозлаза" 44
 Кукумизин 44,85
 — небелковая составляющая 71
 — термостабильность 234
 Кутикюлодеградирующая протеиназа 42
- Лазериндуцированного протонного сдвига метод 113
 Лактамы 16
 — термодинамические параметры Н-связей 20
 Лайнуивера-Берка метод 144,145
 β -лактамаза I 49,372
 — активный центр 86
 — ацилфермент 313
 — гидролиз бензилпенициллина 322
 — значение pK_a активного центра 219
 — ингибирование 254
 — первичная структура 67
 — тип расщепляемой связи 10
 — третичная структура 74
 β -лактамаза II 62
 — значение pK_a активного центра 219
 — небелковая составляющая 71
 — тип расщепляемой связи 10
 — эффективность 192,193
 Лактамазы, ингибирование 262
 β -лактамы 22-23
 — гидролиз 105,322
 — резонансная дестабилизация амидной группы 23,379
 Лактонизация 353,354
 Лантаниды, связывание с амидгидролазами 221
 Лейкоергозингенерирующий фермент 52
 Лейпептин 255
 — "аналог переходного состояния" 263
 — параметры комплексообразования 278
 Лейцинаминопептидаза почек свиньи 56
 — хрусталика глаза
 — — активация Mg^{2+} и Mn^{2+} 222
 — — значение pK_a активного центра 219
 — — ингибирование 252,255
 — — катализ общий основной 317
 — — первичная структура 71
 — — транспептидация 202,315,317
 — — электронная микроскопия 84
 — — эстеразная активность 161
 Лейциноспецифическая протеиназа 47
 Лизинлактамаза *Cryptococcus* sp. 62
 Лизосомная дипептидаза печени 49
 — карбоксипептидаза N 50
 — тирозинкарбоксипептидаза 50
 Лизоцим 302,355
 — ограниченный протеолиз 170
 — протеолитическая активность 97
 — электростатическая стабилизация заряда 355
 Лимитирующая скорость стадия 150
 — — зависимость от pH 220
 Линейные зависимости свободных энергий 177-185
 Липопротеин-сигнальная пептидаза 48
 α -литическая протеиназа *Lysobacter enzymogenus* 41,95
 — — — зимоген 209
 — — — значение pK_a активного центра 219,305
 — — — первичная структура 67,68
 — — — препропоследовательность 209
 — — — термостабильность 234
 — — — третичная структура 74,78
 — — — комплексы, кристаллография 283,292
 Литическая протеиназа *Bacillus subtilis* 41
 Лохистатин 255
 "Лучшее связывание — лучший катализ", принцип 189,190,378
 "Лучшее связывание — худший катализ", принцип 189
- α_2 -Макроглобулин 256,259
 — механизм ингибирования 260
 Макропаин 52
 Макромолекулярные модели амидгидролаз 138-140
 Максимальная скорость 142
 "Медленный" катепсин 54
 Медулазин 45
 Межатомные расстояния, амиды 11
 — — ацетон 13
 — — метиламин 13
 — — углы, амиды 11,13
 — — ацетон 13
 — — метиламин 13
 Мезентерикопептидаза 41
 — ингибирование 261,262
 — топография активного центра 264
 Мемзин 45
 "Меприн" 61
 Меркаптоэтанол, влияние на автолиз папаина 268
 Металлопротеиназы, змей 59-60
 — желудочного сока *Septa* 60
 — микроорганизмов 60
 — синтетическая активность 200
 — тканей позвоночных растворимые 62
 Металлсодержащие амидгидролазы 36, 56-62
 — — активные центры 92-94
 — — ингибирование 247,251-252
 — — каталитические группы 304
 — — координация с водой 310
 — — первичная структура 71,72
 — — — гомология 71,,72
 — — распад тетраэдрических промежуточных соединений 332
 — — структура комплексов 298-302
 — — титрование активных центров 148, 149
 — — третичная структура 74-75,82-84
 Металлоэндопептидазы мембранные тканей позвоночных 61
 — — — направленный мутагенез 199,94
 N-метиламин 164
 Метиламин, электронные параметры 17
 N-метиладетамид, неферментативный гидролиз 101
 Метиладетат 24
 Метилформат 24
 Ne_2 -(метилгистидин-57)- α -химотрипсин 86,196,231,241,260,307
 — синтетическая активность 200
 — "мультипротонный" катализ 308
 Метионилдипептидаза *Escherichia coli* B 58
 Механизм гидролиза, неферментативно-

- го 107-116
 — S_N1 108
 — S_N2 110, 114, 324, 326
 Микроорганизмы, источники белковых ингибиторов 258
 Микропаин 63
 "Микроплазмин" 196
 Микроскопические константы 157, 306, 360
 Микроскопической обратимости принцип 340
 Микросомальные аминопептидазы 56
 — дипептидазы тканей позвоночных 58
 — — *Escherichia coli* B 58
 Миоглобин 31, 32
 — вариации угла ω 29
 Миозин, период полураспада 6
 Михаелиса pH-функции 213
 Мицеллярная энзимология 236
 Множественного родства, теория 359
 Модели амидгидролаз, макромолекулярные 138-140
 Модификация амидгидролаз, протеолитическая 195-196
 — — химическая 196-198
 — — — определение числа функционально важных остатков 240
 Молекулярной механики метод 327
 — — — расчет белок-лигандного взаимодействия 28, 292
 Молозиво коровы 257
 Молярность реакции, эффективная 133
 Мостиковый комплекс в амидах с металлами 21
 Мультикаталитическая протеиназа ретикулоцитов 47
 Мультикаталитические протеиназы 63
 — — электронная микроскопия 78
 Мурамоилпентапептид карбоксипептидаза 50
 Мутации точечные 198
 Нагарсе 41
 Направленный мутагенез 85, 94, 198-199, 300
 "Напряжение" 357, 363
 Напряжения теория 362-364, 367
 — энергия 363
 Нейротензин расщепляемая протеиназа 62
 Нейтральная протеиназа мембран лейкоцитов 46
 — — хрусталика 60
 — — эритроцитов 43
 — — аллостерическая активация 267
 — — *Aeromonas proteolytica* 60, 94
 — — — направленный мутагенез 94
 — — *Bacillus subtilis* 60
 — — — активационные параметры 230
 — — — термостабильность 231
 — — — комплекссообразование 232
 — — *Bacillus cereus*, гомология с термолизин и карбоксипептидазами 84
 — — — термостабильность 234
 — — — ингибирование Na^+ и K^+ 222
 — — — эндопептидаза гипофиза 52
 Нейтронографический анализ 309
 Нексин 257
 Неупорядоченный механизм 143, 244
 Непродуктивное связывание 150-151, 217, 325, 358-362, 368
 Никотинамид 10
 Никотинамиднуклеотиддезамидаза *Azobacterium vielandii* 53
 — тип расщепляемой связи 10
n-Нитроанилид бензоиларгинина 163
n-Нитроанилиды, расщепление протеазами 163
 Нитрофенилацетаты, гидролиз 138
n-Нитрофенилаланин, производные 184
n-Нитрофенилацетат 147
n-Нитрофенилкапроат, гидролиз 138
 Нуклеофильная атака 108-110, 319-323
 Нуклеофильность 310
 Нуклеофильно-электрофильный катализ 116
 Нуклеофильный катализ 7, 117
 Обмен кислорода 203, 317
 Обращенные мицеллы 236
 Общая теория протеолиза 379-382
 Общий катализ 7, 116, 311 сл., 342
 Объем активации 228, 355
 Овомукоида индейки третий домен, комплекс, кристаллография 285
 Овомукоида 257
 Ограниченный протеолиз 6, 171
 — — кинетические параметры 172
 — — механизм 170
 Однобуквенный код 68
 Оксидантная полость 87, 290, 318, 319
 — — деформация в субтилизилах 199
N-(α -оксиацил)-лактамы 111
 Оксипролин 164
 Оксидиназа 56
 5-(*n*-оксифенил)-3-кетоглутаровой кислоты этиловый эфир, гидролиз C-C-связей химотрипсином 204
n-оксифенилпропионовая кислота 204
 5-оксипролилпептидазы, абсолютная специфичность 164
 Олигосахаридные остатки, тип связи с белком 71
 Орбитальный контроль 353-354
 Ориентационный эффект 352, 357
 Оринтиндекарбоксилаза, период полураспада 6
 Основное состояние 372-373
 — — анализ структуры 9
 — — — сравнение с переходным 9
 — — дестабилизация 358, 361-362
 — — выбор 373
 — — свободная энергия 351
 Остановленного потока метод 154
 Панкреатический трипсиновый ингибитор 257, 259, 287
 — — — комплекс с трипсином, кристаллография 288-292
 — — — с трипсиногеном 212
 — — — конформация в комплексе с трипсином 286
 — — — модифицированный, определение активности амидгидролаз 147
 — — — расщепление 172
 Пантетеингидролизующий фермент 64
 Папаин 50, 63
 — автолиз 268
 — активация 209

- активный центр 89-90
- - - сравнение с хемотрипсином 94
- вероятность расщепления связей 194
- влияние D_2O 226
- значение pK_a активного центра 219, 306
- ингибирование 255, 258, 261
- константы скорости комплексобразования 278
- комплексы, кристаллография 284, 292
- криоэнзимология 235
- механизм катализа 342
- - различия от других цистеиновых протеаз 295
- первичная структура 67, 70
- расщепление В-цепи инсулина 160
- "мемб. лимитирующей" жесткость стадии 220
- специфичность 164, 167
- третичная структура 74, 78-80
- эффективность 193, 192
- Парапепсин 1 53
- Пенициллинамидаза 49
- ингибирование 261
- тип расщепляемой связи 10
- топография активного центра 264
- эстеразная активность 161
- Пенициллопепсин 54
- активация 265
- комплексы, кристаллография 284, 296
- специфичность первичная 297
- структура первичная 70
- - комплексов 295-298
- - третичная 74, 80, 81
- Пенициллины, гидролиз 105
- кристаллография 23
- субстраты амидгидролаз 10
- Пепсин А 53, 63
- автолиз 268
- - активация 265
- - активационные параметры 230
- - вероятность расщепления связей 194
- - влияние D_2O 226
- - значение pK_a активного центра 219-220, 305, 306
- - "идеальный" субстрат 297
- - иммобилизация 203
- - ингибирование 243, 244, 245, 250-251, 255, 258
- - катализ обмена кислорода 203
- - общий основной нуклеофильной атаки 317
- - - переноса протона 332
- - - - переноса протона 332
- - катионсвязывающий центр 297
- квантово-химическая модель механизма действия 332
- - кинетика гидролиза пептидов 168, 146
- - комплексобразование с пепсином, стабильность 263
- - комплексы, кристаллография 284
- - константы скорости комплексобразования 278
- - механизм катализа 342-344
- - ограниченный протеолиз 171
- - определение 148
- - первичная структура 63, 70
- - подвижность доменов 297
- - расщепление В-цепи инсулина 160
- - связь K_m и K_{cat} 190
- - синтез-гидролиз 317
- - специфичность первичная 164, 297
- - вторичная 167-168, 297
- - структура комплексов 284, 295-298
- - транспептидация 201-202, 317
- - третичная структура 74, 80-81
- - фосфатная группа 73
- - чередование вторичных структур 82
- - эстеразная активность 161
- - эффективность 192
- Пепсины В, С, D 53, 73
- первичная структура, гомология 70
- Пепсиноген, активация 209-211,
- Пептидин 63, 54, 255, 263-264, 276, 278, 284
- аналоги 255-256
- - спин-меченные 297
- сходство с переходным состоянием 256, 263
- Пептидазы 36
- маиса 62
- Пептидаза А дынного дерева, цистеиновая 50
- - яда *Agkistrodon* метало-содержащая 60
- В 50, 63
- М 57
- "PZ" 52
- маиса 62
- "Пептидаза а" 57
- D-Ala-D-Ala-пептидаза, комплекс 284
- Пептидальдегиды 261
- Пептидальдегиды, аналоги переходных состояний" 263
- кетоналоги 288
- Пептидиборные кислоты 261-262
- Пептидильглицинамидаза тканей позвоночных 39
- Пептидильглутаминаза *Bacillus circulans* 53
- Пептидильдипептидазы 36
- Пептидильпролин *цис-транс*-изомеразы, механизм катализа 288
- Пептидильфторметилкетон, ингибиторы протеаз 263
- Пептидкетон, фторированные, ингибиторы сериновых протеаз 246
- Пептидная связь фланкирующая 27
- - гидролиз 101
- - демаскирование 170
- Пептидный синтез ферментативный, pH-зависимость 200
- Пептидоглутаминазы I, II микробные 53
- Пептидонитрилы 246
- Пептиды, конформация 25-29, 292
- флуктуационная динамика 29
- геометрия 29
- роль "ближних" взаимодействий 29-30
- Первичная специфичность 158, 163-166, 278, 374, 375
- структура 65-73
- - консерватизм аминокислотных последовательностей 69
- Перенос протона 113-116, 323, 327-332
- квантово-механическая теория 115
- - диффузионный контроль 113
- - "туннельный" 356
- электрона 370

- "Перехвата" метод 314
 Переходное состояние 107-108, 260, 345, 354, 356, 382
 — активационный барьер 372
 — анализ структуры 8-9
 — аналоги 260-264, 367, 380
 — заряд 356
 — иммунизация аналогами 97
 — константа ассоциация с ферментом 363, 372
 — компенсация заряда 355
 — конформация 368-369
 — перенос протона по механизму S_N2 328
 — — — синхронный 328
 — — при полифункциональном катализе 357
 — — положение по координате реакции 108
 — — роль объема активации 229
 — — свободная энергия 350
 — — стабилизация 198, 199, 351, 359, 366-369, 372
 — — структура 114, 328-329
 — — четырехчленное циклическое 328
 Переэтерификация, потеря энантиоселективности 225
 — — — увеличение температурной стабильности 225
 Периплазматические протеазы, сериновые I 41
 — — — M1 41
 — — — цитоплазмы Re 41
 "Пинг-понг" механизм 143
 Пикорнавирусы 173
 Пирамидализация амидной группы 109, 287-288, 311, 320, 330-331, 356
 — сложноефирной группы 334
 Пиридины 272
 Пироглутамилпептидаза 1 50
 — II мозга 59
 Пироны 253
 Пируваткиназа 370
 Пиявки *Haementaria officinalis* 257
 Плазма крови, источник белковых ингибиторов 257
 Плазмин 40-41
 — аллостерическая активация 266
 — ингибирование 245, 255
 — определение 148
 — протеолиз проренина 211
 — протеолитическое расщепление 196
 — реакция с хлоркетонами 248
 — специфичность вторичная 167
 Плазминоген 212, 267
 Поверхностно-активные вещества 137-138, 236
 Поли-4-винилпиридин 138
 Поли-N-винилимидазол 138
 Поликарбоновые кислоты, модификация трипсина и химотрипсина 197
 Полифункциональный катализ 130-137, 357
 Полиэлектролиты, модели амидгидролаз 138
 — комплексы с белками 138
 Полиэтиленимины 138
 Полуацетали 263
 Полуспецифические субстраты 183, 184
 Полукетали, аналоги переходного состояния 246
 31. В.К. Антонов
- Поряизация карбонильных групп 357
 Полярный эффект 103
 Порядки связей в амидах 17
 — — — сложных эфирах 25
 Постпролиновые эндопептидазы 44
 — — реакция с хлоркетонами 248
 — — специфичность 167
 Потенциальная поверхность реакции 370
 Предельная скорость реакции 192
 Препенициллиназа *Bacillus licheniformis* мембранная, процессинг 211
 Препроферменты 65
 Предстаонарной кинетики методы 154
 Прегормональная сериновая протеиназа 47
 Прокалликреин, активация 209
 Проопиомеланокортинпревращающий фермент гипофиза 55
 Прокарбоксипептидаза A 207, 211
 Прокариоты 347
 Прокатепсин D, активация 210
 Прокколаген N-протеиназы тканей позвоночных 61
 — C-протеиназа тканей позвоночных 62
 Проктаза A 54
 Пролидаза 49
 — стереоспецифичность 188
 Пролитидипептидазы почек 58
 Пролитпептидазы 165
 Пролитендопептидаза плаценты 51
 — адреногипофиза 51
 Пролиназа 58
 Пролитпептидазы 165
 Пролитидипептидазы цистеиновые 49
 Пролитимипептидазы цистеиновые 49
 Пролиткарбоксипептидазы, ткани позвоночных 39
 Пролитспецифические ферменты, абсолютная специфичность 164
 Проокситоцин 62
 Пропоследовательность, размеры 206-207
 "Пропроптаза" 67
 Проренин 196
 Проренин-процессинговая протеаза почек человека 52
 Просоматостин 47
 Простатоспецифический антиген 45
 Протеазы, АТР-зависимые 47, 52, 164
 — Са-зависимые 69
 — ВИЧ-1 (HIV-1) 56
 — — ингибирование 255, 256
 — — первичная структура 70
 — вирусов 48, 52, 173
 — классификация 36
 — кортикальных гранул 46
 — крабов 44
 — крови 85
 — микробные 85
 — митохондриальные тканей позвоночных 52, 61
 — мышечные 52, 54, 59, 64
 — печени 38, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 56, 61
 — ретровирусов аспартатные 82, 165
 — — — структура димера 82
 — — — функционирование 91
 — системы комплементации 63
 — — свертывания крови 63
 — термофильных микроорганизмов

- 165
 - трансмембранные 41
 - хлоропластов гороха 62
Escherichia coli VI 41
 - - VII 41
Serratia marcescens 52
Staphylococcus aureus 43, 50, 51
A. Streptomyces griseus 42
 - - - активный центр 87, 309
 - - - комплексы, кристаллография 284, 337
 - - - первичная структура 68
 - - - третичная структура 74
A, B, D подчелюстной железы позвоночных 45-46
B Streptomyces griseus 42
 - - - комплексы 284
 - - - структура комплексов 284, 286
 - - - третичная структура 74
B Scytalidium lignicolum аспартатная 55, 63
 - - - ингибирование 91
 - - - активный центр 91-92
C, D, E, Streptomyces griseus 42
Do 47
E 45
I Acremonium chrysogenum 43
III Escherichia coli 60
 - *Staphylococcus aureus* 60, 165
La, АТФ-зависимая 47, 164
 - - АТФ как аллостерический активатор 267
Pi 60
Ti 47, 164
RSP-V 45
 - α хрущака мучного *Tenebrio molitor* 43
 - β личинки *Hypoderma lineatum* 43
 Протеиназа А аспартатная 54
 - архебактерий *Desulfurococcus* sp. 42
 - - морской анемоны, сериновая 39
 - фибринолитическая SSPB
Streptomyces spheroides 42
 - цианобактерий *Anabena variabilis* 43
 Протеиназы бобов 38
 - вирусов сериновые 48
 - внеклеточные *Streptomyces rutgersensis* A, D 42
 - внутриклеточные *Badillus* sp. 41
 - змей сериновые 43, 44
 - металлосодеждающие 59-60
 - карциномы кролика 52
 - кожи *Xenopus laevis* 52
 - комплекса "проназа" *Streptomyces griseus* A, B, C, D, E 42, 164
 - лимфы легких овец
 - мембран эритроцитов (EMAP) 55
 - макрофагов, усв. D 51
 - матки свиньи 54
 - мозга 38, 49, 51, 56, 57, 58, 59, 60, 62
 - морской анемоны 39
 - низших грибов 63
 - опухоли мыши 50
 - подсолнечника 43
 - протеосом 164
 - процессинга 47-48, 164
 - семян гречихи 62
 - хемотаксиса 48
 - хроматина 48
 - *Alternaria fomes* 43
Ancylostoma caninum эластолитическая 61
Arthrobacter sp. 42
Astacus fluviatilis 61
Flavobacterium arborescens 42
Lyobacter sp. 65
Sacharomyces cerevisiae ysc E 51
 - - - D 51
Trichophyton rubrum 42
B Sacharomyces cerevisiae 46
 - - yscF 46
 - - yscB *Candida albicans* 46
 - K 42, 164
 - Rec A 48
 - W 50
 ПАВА-протеиназа 61
Zn, H-протеиназа 60
 Протеиназа I *Achromobacter lyticus* 46
 - расщепление И-цепи инсулина 160
I Acremonium chrysogenum 43
Dictyostellium discoideum 52
 - I, II шелкопряда цистеиновые 52
 - II 51
 - III 50
 - IV дынного дерева 50
 Протеогликанрасщепляющие протеиназы тканей и опухолей позвоночных 61
 Протеолиз АТФ-зависимый, механизм 64
 - внутриклеточный нелизосомальный 173
 Протеолитическая активность различных ферментов 97
 Протеосомы 173
 Протона перенос, влияние водородных связей 114
 - - коллизионный 113
 Протонирование расщепляемой группы, кристаллография 310
 Протромбин 208
 - активация фактором Va 196
 Проферменты 65
 Профлавин 218, 231, 242, 276, 278
 Прокимозин, 69
 - направленный мутагенез активационного пептида 210
 - мутация в области процессинга 199
 Процессинг 61
 - предшественников пептидных гормонов 171
 - специфичность ферментов к парам основных остатков 164, 171
 Провонкефалинпревращающий фермент надпочечников 51
 Пурпурный Бербериха 242
 Радиусы атомов Ван-дер-Ваальсовы 271
 Рамачандрана диаграммы 28, 286
 Растворители органические, влияние на амидгидролазы 224-225
 Реакции диффузионно-контролируемые, свободные энергии активации 275
 Регуляторный участок 85, 88
 Резонансная стабилизация 99, 105, 381
 Резонансный эффект 105, 180
 Рекомбинантных ДНК метод 65
 Релаксационная концепция 370
 Релизинг фактор лютеинизирующего гормона 163

- Ренин 55,63
 — активация 196,210
 — ингибирование 246,255
 — направленный мутагенез 199
 — почечный 258
 — специфичность 166,297
 — эффективность 192
 Ренинсвязывающий белок 55;
 — ингибирование почечного ренина 258
 "Реннин" 53
 Рентгеноструктурный анализ 73-74, 236,283-285
 Реорганизация среды активного центра 371
 — зарядом, энергия 356
 "Репортерные" группы 96,247,282
 Ретровирусы 173
 Рибонуклеаза А 32,201
 Ризопуспепсин 54
 — специфичность первичная 297
 — комплексы, кристаллография 284, 296
 РНКазы S 196
 РНК-полимераза, период полураспада 6
 РНК-содержащие вирусы 173
 Родамин G 242,276
 — аминокислотные производные 147
 Рубредоксин 31
 Руссулин 55
- Сайты процессинга, "омега-петли" 171
 Салициловой кислоты амид, гидролиз 130-131
 Саркозин 164
 Сближение 351-353
 Связывание лигандов, кинетика конформационных переходов 282
 — элементарных стадий (катализ) 372
 Связывающий белок фактора роста эпидермиса 48
 — участок 85
 Сегментный синтез пептидов 200
 — — замена воды органическими растворителями 200
 Секвенирование генов 65
 Секрет медицинской пиявки, источник белковых ингибиторов 257
 Секретин, ферментативный синтез 201
 Секреторный лейкоцитарный ингибитор протеаз 285
 Семена растений, источники белковых ингибиторов 257-258
 Семенная жидкость, источник белковых ингибиторов 257
 Семинальный пепсин спермы 54
 Семинин 45
 Сериновые протеиназы змей 44
 — — вирусов, сходство с цистеиновыми 69
 — протеазы, водородные связи в комплексах 290
 — — "инвентаризация протонов" 308
 — — ингибирование 262
 — — панкреатический 85
 — — *Staphylococcus aureus* 43
 — — — влияние ионов 223
 — — электростатическая стабилизация заряда 355
 — амидгидролазы, активные центры 85-89
- — — молекула воды 328-329
 — — — "система переноса заряда" 308,335
 — — ацилферменты 336
 — — ингибирование 63,247-249
 — — каталитические группы 85-89, 304-305,307-310
 — — константы ассоциации с ионами Ca^{2+} 221
 — — консервативность остатка Glu193 85
 — — обращение специфичности 225
 — — оксианионная полость 335
 — — первичная структура 65-67,68
 — — — гомология 68
 — — структура комплексов 283-284, 288-292
 — — титрование 147,148
 — — третичная структура 73-74,75-78
 — — — локализация воды 77
 — — карбоксипептидазы 346
 — — эндопептидазная активность 163
 — протеиназы 36
 — — микробные 41
 "Серпины" 257
 Сигнальные пептидазы 48,165
 — протеиназа IV *Escherichia coli* 41,173
 — — цитоплазмы II 41
 — пептиды, вторичная структура 165
 — процессинг 172
 — последовательности, организация 173,206
 — — правило "-1,-3" 206
 Сильные постоянные амидов 17
 — — сложных эфиров 25
 "Синдром" *n*-нитрофениловых эфиров 140
 Синкаталитические ингибиторы 252-254
 Синхронизация 136-137,369
 Синхротронное излучение 96
 Система коагуляции крови, первичная специфичность ферментов 164,208
 — — — — белок C 165
 — — кининоген-кининовая 208
 — — компонента, активация 208
 — — ингибирование 256
 — — ингибитор C1-фактора
 — — фактор C1r 46
 — — — C1a 46,278
 — — — C4b 46
 — — — C2b 46
 — — — C3b 46
 — — — Bb 46
 Система переноса заряда 87,89,168, 307-311,319,
 — протеолиза АТР-убикитин зависимая 173
 — — АТР-зависимая 173
 — — фибринолиза 208
 Скорости реакций начальные, определение 146
 "Скручивание" 311
 Сложноэфирная группа 23-25
 — — геометрия 24
 — — значение pK_a 114
 — — конформация 24
 — — резонансная стабилизация 24
 — — резонансные формы 23-24
 — — свойства 23-25

- -- щелочной гидролиз 102,113
- -- электронная структура 24-25
- Согласованный механизм 113,114
- Соевый трипсиновый ингибитор 172, 196,201,257
- -- активный центр 259
- -- комплекс, кристаллография 285
- Сольватационные эффекты 354-355
- Соматостатин 28-конвертаза 62
- Состояние ионизации аминокислот 25
- -- пептидов 25
- Спектроскопия микроволновая 12
- "Спермозин" 40
- Glu,Asp-специфические протеиназы 43
- Специфический катализ 116
- Специфичность амидгидролаз 158-190, 377-378
- -- абсолютная 164
- -- вторичная 158,167-170,185
- -- двойственная 163
- -- конформационная 189
- -- общая характеристика 159-163
- -- определение понятия 159
- -- первичная 158,163-166
- -- "групповая" 164
- -- позиционная 158,163,164
- -- сравнение с эффективностью 193-194
- -- статистический анализ 174-177
- -- третичная и четвертичная 158, 170-173
- Спирты, ингибирование 242
- Статин (Sta) 254,285
- роль β -углерода в комплексообразовании пепстатина с пепсином 263
- Статистическая термодинамика 352
- Стафилококковая сериновая протеиназа "a" 43
- -- "b" 43
- -- цистеиновая протеиназа 51
- -- активный центр 89
- Стекинг-взаимодействия остатков триптофана 295
- Степени свободы, трансляционные 280
- Степень уточнения, кристаллографические модели 73
- Стереоспецифичность 158,185-189,359
- антител 97
- вторичная 188-189
- инверсия 187-188
- моделирование 138
- первичная 186
- роль в механизме действия протеаз 292
- Стереoeлектронный контроль 109,115-116,329
- Стерический эффект 103,104
- Стефины 258
- Стрептокиназа 212,267
- Стрептококковая протеиназа почек 50-51
- активация предшественника 209
- "Стромелизин" 61
- Субдомены 80
- Субстраты, активная форма 373 сл.
- "закрепленные" 188
- кетоаналоги 288,292
- конформация в активном центре 285-287
- определение активности амидгидролаз 146-149
- с ограниченной конформационной подвижностью 187
- состояние расщепляемой связи в комплексах 287-288,311
- типы расщепляемых связей 10
- Субстратная специфичность 158
- -- уровень "насыщения" 192
- Субтилизин Карлсберг 41,165
- -- активационные параметры катализа 230
- -- комплексы, кристаллография 283, 286
- -- направленный мутагенез 198
- -- окисление Met222 198
- -- третичная структура 74,77
- -- эффективность 192
- -- BPN' 41
- -- ингибирование 261,262
- -- комплексы, кристаллография 262-263,283-284,288
- -- константы скорости комплексообразования 276,278
- -- направленный мутагенез 198
- -- первичная структура 68
- -- связывание Ca^{2+} 221
- -- специфичность вторичная 167
- -- -- первичная 165
- -- -- статистический анализ 177
- -- стереоспецифичность 188
- -- топография активного центра 264
- -- третичная структура 74,77
- -- эстеразная активность 161
- -- DY *Bacillus subtilis* 41
- -- -- пропоследовательность 207
- -- E 41
- Субтилизины, комплексы с макромолекулярными ингибиторами 289
- Субтилизинный ингибитор из *Streptomyces* 285
- Субтилизины, активные центры 77, 88-89,200
- действие на термоллизин 196
- мутантные 198
- Субтилопептидаза A 41
- C 41
- Сукцинилхимотрипсин 215
- Сульфитные эфиры, гидролиз пепсином 318
- Сульфонаты 249
- "Суперкислоты" 126
- "Такадиастаза" 54
- Талопептин 278
- Тафта константы, влияние на основность амидной группы 19
- Температурная адаптация ферментов 355
- Температура компенсации 232
- Температурного скачка метод 154
- Теонингидролаза 64
- Теорелла-Чанса механизм 143
- Термитаза 43
- комплекс, кристаллография 284
- термостабильность 234
- Термоллизин 60,63,64
- активный центр 92-94
- -- сравнение с трипсином 95
- -- pK_a групп 219,305
- ингибирование 245-246,255,258

- комплексы, кристаллография 284,
- комплексообразование 319
- - константы скорости 276
- - стабильность 278
- координация с металлом 319
- - с фосфорной группой 263
- модификация, амидазная активность 197
- нуклеофильность воды 319
- - ингибиторов, энергия 280
- отщепление воды 338
- первичная структура 71, 72
- распад тетраэдрических промежуточных соединений 332
- связывание Ca^{2+} 222
- синтетическая активность 200
- специфичность вторичная 167
- стереоспецифичность 188
- термостабильность 234
- транспептидация 202, 315
- S 196
- Термомиколлин, гриб *Malbranchea pulchella* 42
- активация Ca^{2+} 221
- термостабильность 234
- эффективность 192
- Термопсин 55
- Термостабильность белков, доминирующие факторы 235
- Термостабильные протеиназы 234
- *Thermoplasma* 42
- *Thermus caldophilus* 42
- Термофильные аминопептидазы микроорганизмов 57
- - термостабильность 234
- 2,3,4,5-Тетрагидро-2-оксо-1,5-ε-пиперидин 105
- Тетраэдрическое промежуточное соединение 100-101, 108, 110-113, 121, 324-327
- - - значение pK_a 328-329
- - - константы равновесия 327
- - - конформация 115
- - - криовизимология 236
- - - модель переходного состояния 297
- - - протонирование 319
- - - квантово-химические расчеты 328
- - - - через промежуточный акцептор-донор 328
- - - - распад 115, 127, 327-332
- - - - стабилизация 319, 327, 355
- - - - стабильное 111
- - - - структура 300
- Тиоацеталь 263
- Тиолиз амидов 123
- Тиолсубтилизин 196-197, 322
- синтетическая активность 200
- Тионин 242
- Тионы, гидролиз 162
- Тиорфан 247
- Тиоэфиры, гидролиз 162
- Тироидная аспаргатовая протеиназа 55
- Тиролиберин 59
- "Тозильная яма" 86, 88
- Токсин "е" 59
- Тонин 46
- сравнение с химотрипсином, трипсином и эластазой 77
- Торсионный барьер 29
- Транспептидация 201-203, 314, 315, 338-340
- кинетика 144, 202, 338
- включение ^{18}O 315
- Транс-циннамоилмидазол 147
- Транс-циннамоилхимотрипсин, скорость деацилирования 189
- Третбутилацетат 139
- Третичная специфичность 158, 170-173
- Трехточечного связывания теория 359
- "Трехцентровая" связь 20
- Триаза 47
- Триггер процессов каскадных 6
- Триозофосфатизомеразы 357
- Трипептидаминопептидаза эритроцитов тканей позвоночных 56
- Трипептидилпептидаза I яичников свиньи 38
- II печени 38
- - эритроцитов 38, 85
- Трипсин 40, 309
- автолиз 268
- активация 266
- - Ca^{2+} 221
- - - константы ассоциации 221
- - - активность α , β и γ 196
- - - активный центр 88
- - - pK_a групп 219, 305
- - - сравнение с термолизом 94-95
- - - активационные параметры катализа 230, 232
- - - влияние D_2O 226
- - - температурная зависимость 227
- - - гидролиз амидов и эфиров 179
- - - циклопептидов 162
- - - ингибирование 241, 242, 253, 255, 261
- - - - группоспецифическое необратимое 247-248
- - - комплексообразование, стабильность 278
- - - константы скорости 276
- - - комплексы, кристаллография 140, 283, 286
- - - пирамидализация 287, 288
- - - криовизимология 235
- - - модель связывающего участка 140
- - - модификация, изменение специфичности 197
- - - направленный мутагенез 199
- - - - в оценке ионных взаимодействий 237
- - - замена остатка Asp102 309
- - - нейтроннографический анализ 309
- - - определение активности 148
- - - первичная структура 66, 67
- - - сравнение с другими амидгидролазами 68
- - - реакция с диизопропилфторфосфатом 2
- - - с хлоркетонами 247-249
- - - расщепление В-цепи инсулина 160
- - - связывание субстратов аллостерическое 266
- - - синкаталитическое ингибирование 252, 253
- - - смена лимитирующей скорости стадии 220
- - - специфичность, индексы 176-177
- - - инертность к расщеплению дик-

- тошперазинон и циклопептидов 162
- — первичная 163-164,
- — — связи Lys-Arg и Arg-Lys
- — — вторичная, влияние дальних взаимодействий 169
- — — остатки пролина 188
- — — третичная 172,173
- — — стереоспецифичность 188
- — — третичная структура 73,75
- — — сравнение с химотрипсином и эластазой 77
- — — эстеразная активность 161
- Трипсин бесспазоночных 40
- насекомых 40
- Трипсиноген, активация 207
- гидролитическая активность 195
- комплексы с ингибиторами, кристаллография 212,288
- расщепление трипсином и энтерокиназой 172,196
- реакция с диизопропилфторфосфатом 212
- третичная структура 73
- Триптофансинтаза 64,173
- Триптазы 45
- Трихлоретан 197
- Триэтилоксонифторборат 197
- Тромбин 40
- влияние D₂O 226
- ингибирование 245,257,259
- — синкаталитическое 252
- комплексы, кристаллография 283
- определение активности 148
- первичная структура 68,165
- — — сравнение с другими амидгидролазами 68
- различные формы 196
- реакция с хлоркетонами 248
- специфичность первичная 165
- — — вторичная 167,169
- — — третичная 172
- — — стереоспецифичность 177
- Тропонин С 69
- Туннелирование 227,358,371
- Тяжелые металлы, ингибирование амидгидролаз 222
- Убикитин (АТР-1) 47,64,173
- механизм деградации белков
- АТР-зависимый 64
- Углеводы в амидгидролазах 71,197-198
- Ультразвуковой релаксации метод 154
- Униформное связывание 371
- Упорядоченный механизм 143,244
- Уравнение Аррениуса 233,235,369
- — условия применимости к ферментативным реакциям 228
- Бренстеда 99,104,118
- — в катализе имидазолом 129
- — значение α 124-125
- линейной зависимости свободных энергий 16
- — отклонение 120,123
- — физический смысл 118-119
- Вант-Гоффа 227,369
- Гаммета 103,118,190
- Дебая-Хюкеля 106,274
- Михаелиса-Ментен 142
- — интегральная форма 146
- Тафта 103,118
- Холдена 154,157
- Эйринга-Поляни 227
- — условия применимости к ферментативным реакциям 228
- Урокиназа 44
- ингибирование 257
- определение 148
- Уропепсин 53
- Уходящая группа, протонирование 127, 140
- Фактор антигемофильный 44
- Виллебранда 43
- коагуляции Va 40,165,208
- — Ха, ингибирование 208
- — XIa 44
- — XIIa 45,209
- кристмас 43
- роста нервов 85
- — — активация 209
- Стюарта 40
- Хагемана (XII) 45,208
- — активация 209
- С краба 43
- Н-фактор 45
- Р-фактор 73,74
- Факторы коагуляции 63,43
- — первичная структура 68
- — реакция с хлоркетонами 248
- — специфичность первичная 164
- — — вторичная 169
- — комплемента 46,63
- — аллостерическая активация 267
- — — первичная структура 68
- — — специфичность 164
- "Фасеолин" 38
- Фенантролины 64,251
- 4-Фенил-3-амино-2-оксимасляная кислота (Pab) 254
- Фенилаланилдидтирозин, метиловый эфир, комплекс с пепсином 284,295
- 3-Фенилбензиловый спирт 139
- Фенилборная кислота 262-263
- механизм ингибирования 262
- Фенилметансульфонилфторид 37,248
- Фенилпропиональ 249
- Фенолы, ассоциация 272
- Фермент "вылупления", сериновый *Xenopus laevis* (Hatching enzyme) 46
- — металлосодержащий морского ежа 61
- — — *Cryzies latipes* 61
- Фермент-ингибиторный комплекс, жесткость 292
- Фермент-субстратный комплекс, популяция колебательно-возбужденных состояний 370
- Фермент — "машина" 369-371
- Ферменты пищеварительные, специфичность 164
- модифицированные, с пониженной амидазной активностью 200
- эффективность 354
- Феррицитохром С 32
- Фибриноген, протеолиз тромбином 172
- Фибриногеназа 2 44
- Фибринолиз 208
- Фибринопептиды 172
- Фибробласты 257
- "Фиксированный" комплекс 274-275
- Фицин 50,63
- ингибирование 258

- небелковые составляющие 71
- первичная структура 67
- - - гомология 70
- - - синтетическая активность 200
- "Флавоскобин" 44
- Флуоресценция, определение pK_a 220
- Франка-Кондона принцип 357
- Фри-Вильсона, метод 176
- Фононы 369
- Формамид, внеплоскостная деформация 13
- микроволновые спектры 13
- реакция с гидросульфид-анионом 123
- электронные параметры 17
- в ферментативном синтезе 200
- Формиламинокислоты 10
- Формилглютаматдеформилаза 62
- Формилметилонидеформилаза тканей позвоночных 53
- 5-(Формилоксиамино)-2-аминовалериановая кислота (Oav) 254
- Формил-L-триптофан, комплекс с химо-трипсином 289
- Форосимитин 255
- Фосфат, аллостерический активатор 267
- в амидгидролазах 73
- Фосфиновые кислоты 247
- Фосфоамидон 255, 263, 276
- комплекс с термолизинном 284, 301
- сходство с переходным состоянием 256, 263
- Фосфоорилаза А 173
- Фторкетоны, механизм ингибирования 249
- Форметилкетоны 249
- Хеммонда, постулат 120, 183, 343
- Химазы II тучных клеток, сравнение с химотрипсином, трипсином и эластазой 77
- Химазы I, II 45
- первичная специфичность 166
- Химическая модификация, определение pK_a 220
- Химозины А, В, С позвоночных 53
- автолиз изоформ 268
- активный центр, значение pK_a 219
- первичная структура, гомология 70
- специфичность первичная 297
- Химопапаины А, В, С 50
- активный центр 89
- - - значения pK_a 219, 305
- первичная структура 69
- - - гомология 70
- Химостатин 255
- комплексы 284
- "аналог переходного состояния" 263
- Химотрипсин А 39, 308
- автолиз 268
- - промотирование голубым Эванса 268
- активация Ca^{2+} 221
- активность, определение 147, 148
- активный центр 86
- - - значения pK_a 219, 305
- - - сравнение с папаином 94
- - - топография 264
- активационные параметры катализа 230
- - вероятность расщепления связей 194
- - влияние D_2O 226
- - гидролиз пептидов, кинетика 169
- - гидрофобизация 197
- - - зависимость от гидрофобности боковой цепи 178, 185
- - - сложных эфиров 179, 181
- - иммобилизация 235
- - ингибирование 241, 255, 261
- - - "синкаталитическое" 252, 253
- - катализ обмена кислорода 203
- - комплексы, кристаллография 283, 286
- - константы скорости комплексообразования 276, 278
- - криовизмология 235
- - механизм катализа 341
- - ингибирование эфирами полиэтиленгликоля 197
- - определение 147, 148
- - остатки Туг и Trp 32
- - первичная структура 65-67, 68
- - различные формы 66, 75, 195-196
- - расщепление В-цепи инсулина 160
- - реакция с хлоркетонами 248
- - связь K_m и k_{cat} 190
- - синтетическая активность 200
- - специфичность, индексы 176
- - - вторичная 167-169
- - - гидролиз дипептидов 168
- - - влияние дальних взаимодействий 169
- - - первичная 164, 166
- - - третичная 172
- - сравнение с δ -формой 196
- - - искусственными катализаторами 139
- - стереоспецифичность 186-188
- - термодинамические параметры комплексообразования 231
- - тип расщепляемой связи 10, 11
- - транспептидация 315
- - третичная структура 73, 75-76
- - - сравнение с трипсином и эластазой 77
- - - - с папаином 94
- - эстеразная активность, сравнение с амидазой 161, 200
- - эффективность 192
- - зависимость от выбора модели 349
- В 39
- - первичная структура, гомология разных форм химотрипсинов 66
- - - - с другими сериновыми протеазами 68
- С 39
- - расщепление В-цепи инсулина 160
- α -Химотрипсин, димер 77
- - сравнение с γ -химотрипсином 95
- γ -Химотрипсин, сравнение мономерной формы с α -формой 77
- сравнение с α -формой 95
- третичная структура 73
- δ -Химотрипсин 66, 196,
- образование при автолизе 268
- Химотрипсиновый ингибитор 2 из зерен ячменя 285

- Химотрипсин, минорные формы (π, χ, μ, ω) 66
- гидролиз циклопептидов 162
 - образование при активации зимогена 208-209
- Химотрипсиноген 66
- активация 207-208
 - неактивный зимоген 207
 - пропослеовательство 207
 - расщепление трипсином 172
 - реакция с диизопропилфторфосфатом 212
 - система переноса заряда 307
 - третичная структура 73
 - — сравнение с химотрипсином 212
- Химотрипсин, назокоим 33
- Химоеластаза 42
- Хиральные молекулы, связывание 139
- Хлорметилкетон 248-249, 290
- π -Хлормеркурибензоат 63, 89
- Холинэстеразы, протеолитическая активность 97
- Центры нуклеации 31
- Цефалоспоринолаза α мр С 49
- Цефалоспорино С, комплекс 285
- Цефалоспорины* 22-23, 285
- гидролиз β -лактамазой 193
- Цефалоситин 166
- Цефалотин 166
- Циклоамидазы 36
- Циклодекстрины, катализ гидролиза π -нитрофенилацетата 139, 140
- Циклолы 111-112
- Циклооктаамилоза 140
- Циклопептиды, расщепление химотрипсином и трипсином 162
- Циннамоилмидазол- π -транс 147
- π -цис 189
- Цис-амидная связь в амидгидролазах 77, 80
- Цистатин А, направленный мутагенез 260
- Цистатины 258
- взаимодействие с папаином, модель 295
 - комплексы 284
 - консервативные участки 260
- Цистеинилглицин дипептидаза 58
- Цистеиновые амидгидролазы 63
- — активации механизм 209
 - — активные центры 89-90
 - — — титрование 146
 - — — значения pK_a 219, 305
 - — ацилферменты 336
 - — ингибирование 249-250, 258
 - — "псевдонезобратимое" 246
 - — каталитические группы 89-90, 304, 305
 - — комплексы, кристаллография 283-285, 292-295
 - — первичная структура 67, 69
 - — — гомология 70
 - — третичная структура 74, 78-80
- Цистиламинопептидаза сыворотки крови 56
- Цитозольная инсулин-глюкагоновая протеиназа 52
- Цитозольные аминопептидазы микроорганизмов 56
- — аллостерическая активация 267
 - — кристаллика глаза 56
- Цитоплазматические протеазы, сериновые II 41
- — — Pa 41
 - — — So 41
- Цитохром С 148
- Цитратсинтаза 357
- Четвертичная специфичность 158, 170-173
- структура белков 31
 - — — устойчивость к протеолизу 173
- "Четырехзубая" модель специфичности 359-362
- Число оборотов 142
- Чувствительность белков к протеолизу 170
- Шкалы гидрофобности 26
- Щелочные протеиназы микробные, сериновые 41-42
- — — — B 41
 - — — — C 42
 - — — цистеиновые 52
- Эволюция химических механизмов 347
- Эглин 257
- С 283, 284, 286, 288, 289
- Экзопептидазы, определение 10
- Экспорта белков процессы 171
- Экспрессия 140
- Экстракционно-конформационная модель 367
- Эластаза *Pseudomonas aeruginosa* 60
- лейкоцитарная 45, 166, 220
 - — активация 265
 - — ингибирование 246, 257
 - — комплексы, кристаллография 283, 286, 288
 - — реакция с хлоркетонами 248
 - — нейтрофилов, активация 209
- Эластазы панкреатические I, II, III 45
- — активационные параметры катализа 230
 - — D_2O 226
 - — ингибирование 241, 246, 255, 257, 259, 261,
 - — комплексы, кристаллография 283
 - — определение 148
 - — остатки Tyr и Trp 32
 - — первичная структура 66
 - — — гомология 68
 - — расщепление В-цепи инсулина 160
 - — реакция с хлоркетонами 248
 - — связывание Ca^{2+} 221
 - — синкаталитическое ингибирование 252-253
 - — специфичность 132, 134
 - — — вторичная 167
 - — — влияние на ацилирование
 - — — первичная 164, 165, 166, 169
 - — — стереоспецифичность 188
 - — третичная структура 73, 75
 - — — сравнение с трипсином 77
 - — — эстеразная активность 161
- Эластатиналь 255
- "аналог переходного состояния" 263
- Эластин 148
- Эластолитическая протеиназа 45
- Эластоподобная протеиназа 48

- Электронно-конформационные взаимодействия 371
 Электростатические эффекты 355-356
 Электрофильный катализ 318, 343
 Элементарный акт 136, 372-373
 Эндоолигопептидаза В, вторичная
 специфичность гидролиза брадикинина 170
 Эндонептидаза "24.11", см.
 металлоэндонептидаза мембранная
 Эндонептидазы, миелина 55
 — определение 10
 — почек 62
 — специфичность 164
 — тканевая 52
 — фактора роста нервов (ФРН) 48
 Эндотиапепсин 54
 — комплекс с пепстатином 284
 — комплексы, кристаллография 296
 — — с субстратом 287
 — специфичность первичная 297
 — подвижка доменов при
 комплексобразовании 297
 Энергия сольватации 273
 — резонанса амидной группы 15
 — фермент-субстратного взаимодейст-
 вия 302
 Энкефалин, гидролиз 56
 "Энкефалиназа" 57, 165, 196
 Энкефалины, ферментативный синтез 201
 Эноллактоны 253
 Энтальпийный контроль 229
 Энтальпия гидролиза амидов 100
 — связывания 280
 "Энтатическое состояние" 357
 Энтерокиназа 41, 63, 207
 Энтеропептидаза 41, 171, 196, 207
 — специфичность 164
 Энтропия гидролиза амидов 101
 — комплексобразования 280
 1,2-Эпокси-3-(*n*-нитрофенокси)-пр-
 251,
 Эстеразная активность 161, 343
 ВЛП-эстераза 45
 Эстеразы, ингибирование 262
 Эстеропептидаза 45-46
 Эстеразная и амидазная активности
 различный тип связывания как
 причина их различия 162
 Этиленгликоль 200
 Этилендиаминтетрауксусная кислот-
 64, 251
 Этилендиаминхимотрипсин 215
 N-этилмалеинимид 63
 Эфиры, алкиниловые 249
 — аминокислот 99-100
 — сравнение скоростей гидролиза
 амидгидролазами 319
 — — ферментативный синтез 200
 "Эффект Цирцеи" 7
 Эффективность 190-193, 376-377
 — ингибиторов микробных 254
 — каталитическая 372
 — сравнение со специфичностью
 193-194
 Эукариоты 347
 Эуфорбаины латекса 47
 Яд змей, источник белковых
 ингибиторов сериновых протеаз 2!
 ЯМР 96, 170, 220

- Абатуров Л.В. [1379,1380] 96
 Азарян А.В. [183] 37,159
 Айсина Р.Б. [2039] 189
 Александров И.В. [1624] 136
 Александров С.Л. [1477,2513,3252,3265,3311] 110,235,318,319,320,321,328,332
 Алексеев Л.И. [776] 51
 Алиев Р.Э. [3120] 292
 Америк А.Ю. [603] 47
 Амиц Э. [1461] 106
 Андреева Н.С. [1268,1269,1303,1358,3128] 74,80,81,82,94,295,331
 Антонов В.К. [58,1326,1715,1731,1782,2029,2189,2478,2563,2847,3000,3227,3232] 16,86,150,151,154,162,164,187,188,189,196,204,233,242,261,264,267,268,277,286,288,314,315,316,317,332,346,370,373
 Арнетт Э.М. [117] 25,119
 Бархударян Н.А. [858] 54
 Белл Р. [1423] 101,118,119
 Беловолова Л.В. [3423] 370
 Белозерский М.А. [920] 55
 Бендер М.Л. [8] 7,98
 Березин И.В. [1207,1628,1659,1719,2037,2041,2398,2539,2544,3329,3350,3412] 66,137,138,141,146,147,151,155,189,190,194,196,212,222,237,238,239,335,349,367,368
 Билай Т.И. [2483,2491] 234
 Бландел Т. [1219] 73
 Блюменфельд Л.А. [2450,3419,3420] 228,232,233,349,369
 Боровикова В.П. [339] 41
 Брандтс Д.Ф. [2479] 233
 Брюс Т. [1401] 98,102,118,121,125,130
 Ваганова Т.И. [994,1098] 57,60
 Ванчугова Л.В. [2780] 257
 Варфоломеев С.Д. [2564,2565] 242,275,276
 Васильева Х.И. [409] 43
 Веселова М.Н. [2051] 194
 Войтук А.А. [3197,3267,3413] 311,320,368
 Волькенштейн М.В. [3395,3428] 358,371
 Воскобойникова Н.Е. [1188] 62
 Вржец П.В. [2540] 239
 Гайда А.В. [904] 55
 Герман Э.Д. [1512] 115,358
 Гинодман Л.М. [1732,3235] 154,317,370
 Годжаев Н.М. [3094] 286,292
 Гоголюбов М.Ю. [2140,2153] 200
 Горбаленя А.Е. [817] 52
 Гульник С.В. [1112] 60,234
 Гурова А.Г. [1730] 154,315,333
 Дженкс В. [1404] 98,223,354,357,363
 Дмитриева М.Г. [1436] 104
 Догонадзе Р.Р. [3427] 371
 Дюзу П. [2421] 224,235
 Дьяченко Е.Д. [1410,1411,2597] 99,100,245
 Елисеева Ю.Е. [1047] 58
 Жирнов О.П. [1945] 173
 Жоли М. [168] 33,233,235
 Зимацева А.В. [2818,2819] 258
 Зинченко А.А. [1907,1955,2901,2902] 168,174,175,190,230,231,232,265,279
 Золин В.Ф. [2373] 221
 Иевлева Е.В. [2814] 258
 Иомптова В.М. [2866] 261
 Казанская Н.Ф. [2030] 188
 Калугер С.В. [373] 42
 Капитанчиков Ю.В. [2147,3277] 200,324
 Караваева Н.И. [2495] 234
 Карпейский М.Я. [3437] 373,374
 Кибирев В.К. [1866] 167,172
 Кири Ю.Е. [1640] 138
 Клесов А.А. [1680,1738,1964,1966,1979,1980,2006,2599,3033,3141] 146,155,156,177,178,179,180,182,183,190,192,197,243,245,265,273,282,299,300
 Козлов Л.В. [1342,1413,1415,2009,2010,2012,2013,2064,2185,2186,2465,2587,3233] 89,99,100,183,184,195,203,210,231,244,251,314,316,333,343
 Колесанова Е.Ф. [1010] 57
 Коппель И.А. [1439] 104
 Косовер Э. [2043] 190
 Костров С.В. [187] 64,159
 Краева Л.Н. [415] 43
 Крейер В.Г. [375] 42
 Кристаллик Л.И. [3430-3432] 371
 Крупянко В.И. [2543] 239
 Курганов Б.И. [1737,1743,2919] 155,156,157,267

* Приведены первые авторы публикаций. В квадратных скобках – номер по списку литературы, без скобок – номер страницы.

- Кайвярайнен А.И. [1378] 96,281
 Лавренова Г.И. [374] 42
 Ламри Р. [1375] 96,217,243,279,281, 363,371
 Латов В.К. [1645] 139
 Левич В.Г. [3429] 371
 Левянт М.Н. [592] 46
 Липкинд Г.М. [3143] 302
 Лихтенштейн Г.И. [1376,1625,2474, 2475,3031,3271,3272] 96,136,232, 282,323
 Лобарева Л.С. [878] 54
 Локшина Л.А. [5,185] 6,63,159,207
 Лондон Ф. [2937] 270
 Лякишева А.Г. [1729] 153,154,314,315
 Маленков Г.Г. [171] 33
 Мальцев Н.И. [2182] 203
 Мартинек К. [1725,1976,2400,2503, 2536,2553,2554] 153,179,235,241
 Мелвин-Хьюз Э.А. [2966] 275
 Мелик-Нугбаров Н.С. [2500] 235
 Мосолов В.В. [1748,2081,2713] 159, 196,254,256,260
 Мосолова О.В. [407] 43
 Никольская И.И. [2038] 189
 Остерман А.Л. [1082] 59,167
 Паберит Н.Ю. [1099] 60
 Пальм В.А. [1432] 103,105
 Петрова Е.Н. [2253] 210
 Поляков К.М. [1295] 74
 Попов А.А. [3230] 315,316
 Попов Е.М. [132,153,1386,3024,3121] 28,30,96,280,281,286,290,292,302, 328,335
 Попова С.В. [1671] 144
 Потапов В.М. [103] 22
 Рапли Д.А. [1360] 95
 Ревина Л.П. [1853,1924] 165,171
 Ротанова Т.В. [2857,2863] 261,262, 264
 Руденская Г.Н. [410,908,1084] 43,55, 59
 Румш Л.Д. [1990] 182,246
 Савин Ю.В. [2399] 222
 Самокиш В.А. [2568] 242
 Сарбаканова Ш.Т. [243,921] 38,55
 Сафро М.Г. [1273,1937] 74,171
 Сахаров И.Ю. [475] 44
 Серейская А.А. [2068] 196
 Сидоренко Н.П. [3421] 369
 Симонова Г.В. [1740] 156
 Степанов В.М. [836] 53
 Суrowая А.Н. [2293] 212
 Сыркин Я.К. [1494] 114
 Тамман Г. [3396] 358
 Тафт Р.У. [1431] 103
 Тиходеева А.Г. [2323] 219
 Тралезникова С.С. [1063] 59
 Уэбб Л. [2425] 224,237,239
 Фершт Э. [1613] 135,141,146,190,212, 215,304,349,357,366,367
 Хайдарова Н.В. [408] 43
 Хеммис Г. [1736] 154
 Хоштария Д.Э. [2443,2448] 226,227
 Хургин Ю.И. [3186,3378] 309,355
 Чернавский Д.С. [3417] 369,370
 Чиргадзе Ю.Н. [66] 17
 Чулкова Т.М. [685,986] 49,57
 Шамин А.Н. [7] 7
 Швадас В. [1196,2865] 62,261
 Шноль С.Э. [3425] 370
 Шустер Ю. [2142] 200
 Эйзенберг Д. [170] 33
 Эммануэль Н.М. [3416] 369
 Юсупова М.П. [995] 57
 Ярв Я.Я. [2858] 262
 Aaviksaar A. [2042] 190
 Abdulaev N.D. [2027] 187
 Abita J.P. [1940] 172
 Abraham M.H. [2945] 271
 Abrahamson M. [2796] 258,260
 Achstetter T. [779,780,1023] 51,57
 Adachi H. [1032] 58
 Adams E.Q. [3168] 306
 Adams P.A. [2452,3322] 229,230,333
 Adebodun F. [2878] 262
 Aducci P. [625] 47
 Afting E.-G. [877] 54
 Ajabnoor M.A. [2094] 197
 Akanuma H. [2916] 266
 Akhtar M. [3218] 314
 Akrawi A.F. [1031] 58
 Aksnes G. [1556] 1556
 Alberty R.A. [2296,2961] 214,274
 Alberty W.J. [3434] 371
 Alecio M.R. [1802] 163,164,294
 Alexander R. [3374] 354
 Allen M.P. [1823] 164
 Allen R.J. [591] 46
 Allinger N.L. [1551] 125
 Alt J. [199] 64
 Alter G.M. [1372] 96
 Alvarez N.G. [216] 38
 Amaguse S. [917] 55
 Ambler R.P. [201,257] 39,64,86
 Anderson E.G. [3210] 313
 Anderson L.E. [1920] 171,172
 Anderson W.F. [1373] 96
 Andersson L. [2881] 263
 Andreeva N.S. [1267,1300,1370] 74, 80,284,287,295
 Andrews A.T. [1701] 148
 Andrews P.C. [443] 44
 Angelides K.J. [2521,2522,3302] 235, 276,278,326
 Anson M.L. [2268] 211
 Antonini E. [2313] 219,220
 Antonov V.K. [870,1443,1667,2040, 2574,2848,3174,3228,3229,3231, 3266,3344] 54,104,144,187,189,190, 202,203,243,261,262,263,307,310, 314,315,316,317,320,324,338,339, 343,345
 Aoki K. [773] 51
 Aoki Y. [511] 45

- Aoyagi T. [2718,2721] 254
 Ardelt W. [500,2779] 45,257
 Argade P.V. [3100] 288,334
 Argos P [1348,2497] 92,93,94,95,235, 302
 Arlaud G.J. [554,556,558] 46,164
 Armbruster A.M. [95] 21
 Arnett E.J. [73] 19
 Artymiuk P.J. [1383] 96
 Arvidson S. [405,1120] 43,51,60
 Asahi M. [390] 42
 Asboth B. [3259,3260] 319
 Ascenzi P. [1684,2059,2314,2340, 2341] 147,194,219,220
 Asgeirsson B. [305] 40
 Ashley P.L. [550] 46
 Aswanikumar S. [801] 52
 Atassi M.Z. [1653] 140
 Athauda S.B.P. [833] 53
 Atlas D. [1840,1871] 165,167,188
 Averbukh I.S. [3422] 369
 Avraham R.B. [2090] 197
 Auer H.E. [2237] 210
 Auffret C.A. [1882] 167
 Auld D.S. [1768,2093,2327,3242,3244] 161,167,197,219,230,317,319,338
 Austen K.F. [2218] 208
 Azuma T. [875] 54
 Baba T. [333,336,2222] 41,209
 Bachovchin W.W. [2350,2879,3180, 3183,3184] 220,262,305,308,309,327
 Baek D.-J. [2702] 253
 Bagdy D. [2747] 256,257
 Baggott J.E. [2462] 229,230,231
 Balci A. [128] 28
 Bailey J. [112] 24
 Bailey M. [115] 24,25
 Baillargeon M.W. [3098] 287
 Baines B.S. [737] 50
 Baines N.J. [2458] 230
 Bajkowski A.S. [3216] 313
 Baker B.R. [2636] 247
 Baker E.N. [1264,1265,1766] 74,161, 295,313
 Baker J.O. [2331] 219
 Baldwin G.S. [1195] 62,198
 Ballard S.A. [110] 23
 Ballinger P. [1502] 114
 Balls A.K. [1322,1332] 86,89
 Bally M. [1003] 57
 Balny C. [3300] 326
 Bälöw R.-M. [232-234] 38
 Ban Y. [492] 45
 Bando Y. [758] 51
 Baratti J. [332] 41
 Barbas C.F. [2429] 225
 Bardsley W.G. [1741] 156
 Bargetzi J.P. [1213] 71,268
 Barkholt V. [898] 54
 Barlow D.J. [160] 32
 Barlow G.H. [463] 44
 Barnard E.A. [282] 39
 Barrett A.J. [174,181,709,854,1795, 2254,2715,2732,2734,2750,2752,2759, 2835] 35,37,50,53,159,163,210,254, 256,259,260
 Barret D. [1167] 61
 Barth A. [229] 38
 Bartlett P.A. [2618,2626,2891] 247, 263,301
 Baudyš M. [845,902] 53,55
 Bauer C.-A. [1841,1859,1860,3110] 165,167,169,190,192,291
 Bauer K. [704] 50,164
 Baugh R.J. [508] 45
 Baumann W.K. [1825,1858] 164,167, 169,190
 Baumeister W. [1299] 78
 Bayle-Lacoste M. [1818] 164
 Bazan J.F. [656,815] 48,52,69
 Bazzzone T.J. [1055,2294] 58,212
 Beattie R.E. [1710,1789] 148,163
 Bechet J.-J. [2017] 186
 Beck A. [900] 54
 Beckmann J. [2831] 259
 Bednarski M.D. [2156] 200
 Beeley J.G. [2097] 198
 Beesley T. [2855] 262
 Behal F.J. [966] 56
 Beinfeild M.C. [631] 47
 Bek E. [1913] 170,171
 Belasco J.G. [3209,3393,3394] 313, 357
 Belikov V.M. [1644] 139
 Belin D. [466] 44
 Belke C.J. [1588] 131
 Bell G.I. [280] 39
 Bell R.P. [1549] 124
 Belleau B. [2026] 187
 Benajiba A. [962] 56
 Benchetrit T. [2627] 247
 Bender M.L. [1208,1402,1428,1480, 1481,1485,1486,1534,1546,1554,1573 1586,1611,1648,1722,1977,1984,1987 2304,2311, 2575,2584,3144,3225, 3226, 3323] 67,98,102,111,112,113, 122,124,125,126,127,129,130,134, 135,139,140,146,147,153,179,181, 217,219,226,229,230,243,304,314, 324,326,333,349
 Benedetti E. [18,39] 12,14,28,29,30
 Benfey P.N. [528] 45
 Benkovic S.J. [1397] 97
 Bennett W.S. [1911] 170
 Bentley D.R. [564] 46
 Berezin I.V. [1723,1963,1970,2556, 2557,3223] 153,177,178,180,182,186 241,314,367,368
 Bergmann M. [2016,2136,3398] 185, 200,359
 Bergman N.-A. [1508] 115
 Berlet H.H. [916] 55
 Bernhard S.A. [1717,1985,2561,3400] 150,181,242,333,334,359
 Betz J.L. [2102] 198
 Betzel C. [1259,3068] 74,284,288
 Bewly T.A. [1926] 171
 Beynon R.J. [630,1157] 47,61
 Bezeaud A. [1813] 164
 Bicknell R. [1918,2332,2419] 170, 219,224
 Biechler S.S. [1529] 120
 Bielky B.H.J. [2507] 235
 Bieth J.G. [1845] 165
 Birk Y. [2789,2823] 257,258
 Birktoft J.J. [1221,1229] 73,76,77, 212,283,308,335
 Birnbaum E.R. [2375] 221
 Bittner E.W. [3115] 292

- Bizzozero S.A. [1826,1855,1863] 164,
 167,168,194
 Bjarnason J.B. [457,1089] 44,59
 Björk I. [2813] 258
 Blackburn G.M. [1532] 121
 Blair T.T. [2662] 249
 Blau K. [2171] 201
 Blevins R.A. [1224,1225] 73,77
 Blow D.M. [1222,1327,3041,3414] 73,
 75,283,307,308,368
 Blow A.M.J. [1126] 60
 Blumberg P.M. [262] 39,56
 Blumberg S. [725,2088] 50,197
 Blumenfeld O.O. [2932] 268
 Blundell T.L. [1280,1301,3130] 74,
 80,87,296,298
 Bock S.C. [2770] 257
 Bode W. [1233,1239,1242,1243,2287,
 2797,3020,3052,3053, 3056,3096,
 3111] 73,77,212,221,258,260,281,
 283,286,288,289,290,291,293,295,309
 Bodwell J.E. [1058] 59
 Boege U. [657] 48
 Boeker E.A. [1679] 146
 Boguslawski G. [388] 42
 Bohak Z. [843,844] 53
 Bond M.D. [1096] 60
 Bolognesi M.C. [3084,3095] 283,284,
 288,301
 Bone R. [2876,3055] 262,283,292
 Böning W. [3029] 282
 Bonthron D. [428] 43
 Boone B.J. [2640] 247
 Boone T.C. [2828] 258
 Boopathy R. [1392] 97
 Borgford T.J. [3410] 367
 Bosshard H.R. [3345] 349
 Bothwell M.A. [547] 45
 Bott R. [1248,3075] 74,77,284,296
 Bouma J.M.W. [694] 49
 Boussard G. [144] 29
 Boyer P.D. [1727] 153
 Bradshaw R.A. [304,1057] 40,58
 Brady J. [140] 28
 Brady K. [3298] 326,328
 Brakoh N. [1183] 62
 Branchini B.R. [1699] 148
 Brand L. [3032] 282
 Brant D.A. [2938] 271
 Bratovanova E.K. [1709,1877] 148,
 167
 Braun P.J. [2784] 257
 Brayer G.D. [1252,1257,3064] 74,284
 Breaux E.J. [2860,3204] 261,263,313,
 329
 Breddam K. [241,242,2146] 38,200
 Brenner S. [1210] 69
 Bresler S.E. [3222] 314
 Breslow R. [2188] 203,316,317
 Briedigkeit L. [2371] 221
 Briggs G.E. [1663] 142
 Brinigar W.S. [3309] 328
 Brocklenhurst K. [2343,2678,3127,
 3153,3258,3270] 220,250,295,305,
 319,322
 Broom M.F. [823] 53,223
 Brömme D. [1847] 165,194
 Bronsted J.N. [1526,2960] 117,274
 Brooks B.R. [139] 28
 Brown C.R. [335] 41
 Brown J.L. [1038] 58,164
 Brown J.R. [2270] 211
 Brown W.E. [3328] 335
 Browne P. [690] 49
 Brouwer A.C. [2049] 193
 Brubacher L.J. [2004] 183
 Bruice T.C. [1465,1527,1538,1539,
 1541,1572,1576,1577,1578,1587,1612,
 1623,3366,3367] 107,120,122,123,
 129,130,131,134,135,136,305,353,357
 Brunisholz R.A. [328] 40
 Bryan P. [2122] 198,199
 Brzin J. [2809] 258
 Buckingham D.A. [1565,1559] 127
 Bülow L. [1652] 140
 Bünning P. [3317] 332
 Bunting J.W. [1824,2328,2583] 164,
 219,243
 Bürgi H.B. [1469,1470,1471] 109,115,
 311
 Burley S.K. [2955] 273
 Burr M.E. [3030] 282
 Burrows H.D. [1594] 132
 Burton J. [1886,2598] 167,170,245
 Busch W.A. [2376] 221
 Busconi L. [799] 52
 Butkowski R.J. [314] 40
 Butler A.R. [1548] 124
 Butler P.E. [1158] 61
 Buttle D.J. [742,1851] 50,165
 Byers L.D. [2589,3173,3349] 244,307,
 349
 Byrne R. [419] 43,194
 Cairi M. [3338,3339] 336
 Camacho L. [308] 40
 Cambillau C. [504] 45
 Camiolo S.M. [2928] 267
 Campbell D. [568] 46
 Campbell P. [3415] 368
 Caplow M. [1989,1999] 181,183,325
 Capon B. [3368] 353
 Carey P.R. [3092,3336] 286,295,336
 Carias J.-R. [903] 55
 Carles C. [1932,1933,1934] 171,172,
 175
 Carlsen N.R. [38] 14,17
 Carmona C. [404] 43
 Carne A. [752] 51,89
 Carotti A. [1981] 180
 Carpenter F.H. [1414] 100
 Carraway K.L. [2289] 212
 Carroll R. [2758] 256,257,259
 Carroll E.J. [596] 46
 Carter P. [561,2105,2110] 46,198
 Cartwright S.J. [2510,3211] 235,313
 Castoñeda-Agullo M. [2426] 225
 Castillo M.J. [1696,1810] 148,164
 Caswell M. [1619] 135
 Carter P.E. [561,2105,2110] 46,198
 Cawston T.E. [2827] 258
 ~
 Cechova O. [2746,2754] 256,257
 Chaffee E. [1558] 127
 Chambers J.L. [1234,1236] 73
 Chan S.J. [711] 50
 Chan V.W.F. [3155] 305
 Chandrasekaran S. [1123] 60
 Chang C.-N. [2277] 211

- Chang W.T. [2310] 218
 Chang Y.-H. [958] 56
 Chao J. [482,2572] 44,243
 Chao L.-P. [2366] 221
 Chapuis R. [1012] 57,234
 Charpus C. [2276] 211
 Charette M.F. [600] 47
 Charles M. [275,2205] 39,207
 Charnas R.L. [2707] 254
 Charney E. [3327] 334
 Charriaut-Marlangue C. [634] 48
 Charton M. [1438] 104
 Chatonnet A. [1391] 97
 Chauvet J. [2286] 212
 Chatterjee P.K. [653] 48
 Checler F. [1184] 62
 Chen C.Y.S. [84] 20
 Chen K.C.S. [2693] 251,306
 Chen R. [3295] 326
 Chen Z. [3054] 283,288
 Cheng E. [2141] 200
 Cheung H.-S. [1894] 167
 Cheug Y.-S. [1108] 60
 Chiang C. [668] 49
 Chin D.T. [604] 47
 Chin J. [1569] 127
 Chin J.F. [2408] 223
 Chin J.R. [1142] 61
 Cho K. [1868] 167,169,194
 Choi M.-u. [3275] 323
 Chong G.L. [2052] 194
 Choithia C. [127,2944] 28,271
 Chou K.C. [1670,2965] 144,275
 Christensen D.H. [55] 16,17
 Christensen H. [3435] 372
 Christensen U. [1808,2792,2836,2917] 164,167,188,258,260,266
 Christianson D.W. [2628,3077,3078,3079,3264,3297] 247,284,288,298,300,301,302,319,326
 Chung C.-H. [363,601,2913] 41,47,266
 Ciehanover A. [192] 64
 Cieplak A.S. [40] 14
 Civello D.J. [1091] 59
 Claeyss H. [517] 45
 Clark P.I. [1337] 89
 Cleland W.W. [1660,1716,1728,2585] 141,143,150,153,243,381
 Clement G.E. [1216,1749,2326,2336,2430,2444] 73,159,164,219,220,225,226,242,245,279,338
 Clitte S.G.R. [2370] 221
 Coan M.H. [269] 39
 Coddling P.W. [3172] 307
 Cohen G.H. [1227] 73,95
 Cohen L.A. [2076] 196
 Cohen S.A. [2708] 254
 Cohen S.G. [1988,1991,1993-1995,2022] 181,182,183,187
 Cohen W. [2646,2647] 248
 Cole M. [666] 49
 Cole P.W. [2322] 219
 Coletti-Previero M.A. [1005] 57
 Collen D. [2655] 248
 Collins T.J. [96] 22
 Colman P.M. [2394] 222
 Colman R.W. [477] 44
 Compton P.D. [2518,2519,2531] 235,236
 Connelly J.C. [1899] 167
 Cook K.S. [543] 45
 Cooper J.B. [2612,3074] 246,284,295,296
 Cordes E.H. [1579,2946] 129,272
 Corey R.B. [1362] 95
 Cornish-Bowden A.J. [1202,1658,1675,3170] 65,141,145,305
 Costain C.C. [20] 12,16
 Cowan D.A. [391,1124] 42,60
 Cowgill R.W. [2358] 220
 Craik C.S. [300,1199,2123,2124,3185] 40,65,199,309
 Cram D.J. [1647] 139
 Craveri R. [2493] 234
 Creighton D.J. [2344] 220,305
 Crestfield A.M. [1754] 160
 Cromlish J.A. [530,626,627] 45,47,164
 Crowfoot D. [107] 23
 Cruickshank W.H. [2359] 220,305
 Cueni L. [2087] 197
 Cunningham A. [885] 54
 Cuypers H.T. [956,1355] 56,94
 Cybulski S.M. [1493] 114
 Czarniecki M.F. [1649] 139
 Dafforn A. [3362] 353
 Dahlbäck B. [2772] 257
 Dahlmann B. [609] 47
 Dahlquist U. [1753] 160
 Dalbadie-McFarlaud G. [2132] 199
 Dale J.W. [674] 49
 Dalhammar G. [1105] 60
 Damus P.S. [2743] 256,257
 Danielson E.M. [981] 56
 Danley D.E. [852] 53
 Dann J.G. [2613] 246
 Darby N.J. [795] 52
 Darke P.L. [942] 56
 Darvey I.G. [1678] 146
 Das M. [1043] 58
 Davidson H.W. [1079] 59
 Davidson L. [663] 48
 Davidson R. [879] 54
 Davie E.W. [417] 43,45,208
 Davies R.B. [1194] 62
 Davis A.E. [566] 46
 Davis N.C. [688] 49
 Day W.C. [1125] 60
 Dayhoff M.O. [1197] 65,174
 Dean R.T. [1] 6
 De Bruijn M.H.L. [572] 46
 De Camargo A.C.M. [1895] 167,170
 Degen S.J.F. [468,2211] 44,208
 De Haen C. [1203] 65,66
 Dehm P. [987] 57
 Deisenhofer J. [44] 14
 De Jersey J. [2369] 221
 Delaage M. [2367] 221
 Delaney R. [888] 54
 Delange R.J. [951] 56,222
 De Lapp N.W. [1040] 58
 Delbaere L.T.J. [722,1297,3062] 77,284,288,292,322
 Del Bene J.E. [81] 20
 Delisi C. [3354] 352
 De Los De Tar F. [1435,3306] 104,326,327
 Delpierre G.R. [1340,1341] 90,250,251
 Del Mar E.G. [1843] 164,167

- De Martino G.N. [2233] 209
 Denburg J.L. [2324] 219,305
 Deranleau D.A. [2953,2954] 273
 Derkx F.H.M. [2267] 211
 Desautels M. [619] 47
 Deschodt-Lanckman M. [1897] 167
 Deslongchamps P. [1476,1487,1518,
 1519] 109,113,115,116,329
 Desnuelle P. [271,967,2364] 39,56,
 221
 De Souza Otero A. [2457] 229,230,231
 Dewar M.J.S. [172,173,1626,3372] 34,
 136,354
 Devault A. [1154,1353,2129] 61,199,
 287
 Devi L. [778] 51
 Dickie N. [906] 55
 Dideberg O. [1073,1296] 59,74
 DiGregorio M. [2594] 245
 Dill K.A. [2498] 235
 Dimicoli J.L. [3036] 282
 Dionyssion-Asterion A. [2909] 266
 DiScipio R.G. [321] 40
 Dixon M. [1228,1661,2295] 73,95,141,
 212,213,214,227,230,237,279
 Dobry A. [1419] 101
 Dodt J. [2783] 257
 Doherty D.G. [2196] 204
 Donohue J.A. [101] 22
 Doollittle R.F. [705,706] 50,77
 Dorer F.E. [2054,2401] 194,223
 Dorigo A.E. [1621] 135
 Dorovska V.N. [1965] 178,181
 Dorovska-Taran V. [1724,2453] 153,
 229,230,349,381
 Doumeng C. [977] 56
 Dounce A.L. [953] 56
 Douzou P. [2506,2511,2516,2532,2534]
 235,236
 Downmont Y.P. [2170] 201
 Drago R.S. [93] 21
 Drakenberg T. [45] 16
 Drapeau G.R. [402,403] 43
 Drenth J. [148,1250,3122] 29,74,77,
 293,294,310
 Dreyer T. [895] 54
 Driscoll J. [1837] 165
 Drohse H.B. [1935] 171
 D'Souza V.T. [1650,1651] 139,140
 Dubois T. [741] 50
 Duez C. [672,1318] 49,86
 Dufour E. [760] 51
 Dugas H. [1406,2028] 98,188,304,329,
 330
 Dugglely R.G. [1681] 146
 Dunitz J.D. [34] 14,19
 Dunlap R.P. [2606] 246
 Dunlop P.C. [664,665] 48
 Dunn B.M. [1833,1883,1884,2252,2525,
 2994,2995,3379] 164,167,176,194,
 210,235,236,277,355,356
 Dunn N.W. [698] 50
 Dunwiddie C. [2785] 257
 Dupaix A. [1972] 178
 Dzau V.J. [925] 55
 Easthope P.L. [151] 29
 Eaton D.L. [425,469] 43,44
 Edward J.T. [70,1545] 19,123
 Eigen M. [1489,1733] 113,118,154,193
 Eisen A.Z. [470] 44
 Eisenberg M. [2225] 209
 Eisenhower D.A. [214] 38
 Elion J. [316] 40
 Elliott B.W. [590] 46
 Elrod J.P. [2441] 226
 Elsenhans B. [750] 51
 Emi M. [293] 40
 Emori Y. [2815] 258,259
 Endo F. [687] 49
 Endo S. [1162] 61
 Epand R.M. [3198,3212,3214] 313
 Epps D.E. [2614] 246
 Epstein J. [3166] 306
 Erlanger B.F. [2651,2914] 248,266
 Esmon C.T. [421] 43
 Estell D.A. [184,1939,2109,2111] 63,
 172,198,199
 Etlinger J.D. [195] 64
 Evans A.C. [1947] 173
 Evans B.L.B. [3125] 294
 Evans C.M. [1521] 115
 Evans H.J. [2800] 258
 Evans P. [782,783] 51
 Evans S.A. [1682] 146
 Everitt M.T. [524] 45
 Fabiato A. [2380] 221
 Fahnestock M. [491] 45
 Fahrney D.E. [2648] 248
 Falanga A. [794] 52
 Farley P.C. [579] 46
 Fastrez J. [1412,1417,2000,3254,
 3312] 99,100,183,217,272,313,318,
 325,327,329,333
 Favandon V. [2838] 260
 Fauchère J.L. [121] 26
 Faust P.L. [855] 53
 Fay P.J. [424] 43
 Feder J. [2329,2390,2571,2596] 219,
 222,243,245,280,305
 Feeney R.E. [2080] 196
 Fehlhammer H. [1232,1238] 73
 Fehrentz J.-A. [2882] 263
 Feinstein G. [411,507] 43,45
 Feldman S.R. [2837] 260
 Félix F. [1068] 59
 Femfert U. [3249] 318
 Fendler J.H. [1630] 138
 Feracci H. [963,985] 56,57,164,167
 Ferlund P. [2213] 208
 Fersht A.R. [1407,1533,1591,1592,
 1614,2011,2107,2290,2298,2302,2306,
 2947,3175,3282,3409,3411] 100,121,
 122,123,132,134,135,184,192,198,
 212,214,216,217,219,220,272,273,
 291,307,308,325,326,367,368
 Fiedler F. [1864] 167
 Fife T.H. [1567,1564,1568,1603,1608,
 1969] 127,133,134,178
 Figueiredo A.F.S. [860] 54
 Finch P.W. [1109] 60
 Fink A.L. [2005,2428,2504,2505,2512,
 2514,2515,2520,3301] 183,225,235,
 236,278,313,326

- Fischer G. [1896,2035] 167,188
 Fisher J. [670,1856] 49,166,192,313
 Pittkau S. [2696] 252
 Fitzpatrick P.F. [3217] 313
 Fletcher T.S. [301] 40
 Florentin D. [1704] 148
 Fodor E.J.B. [595] 46
 Folk J.E. [287,1060] 39,59,160
 Foltmann B. [850,851,1211,2933] 53, 69,268
 Fong D. [712] 50
 Fonseca P. [331] 41
 Fontana A. [1928] 171
 Forrest W.W. [1421] 101
 Forsgren M. [327] 40
 Fraenkel G. [68] 19
 Franke A.E. [2793] 258
 Frankfater A. [1787] 162,163
 Fraser M.E. [1283] 74
 Free S.M. [1957] 176
 Freeman H.O. [92] 21,22
 Freer S.T. [2281] 212
 Freisheim J.H. [2271,2274] 211
 Freitas J.O. [1019] 57
 Frère J.-M. [256,259,1447] 39,105, 202,254
 Frick L. [2884] 263
 Fricker L.D. [1077] 59
 Fried V.A. [620] 47
 Friedberg F. [2579] 243
 Fritz L.C. [2264] 210
 Fröhlich M. [3418] 369
 Frohne M. [1354] 94
 Fromm H.J. [1657,1669] 141,144
 Fruth U. [536] 45
 Fruton J.S. [1750,1881,1906,2137, 2167,2174] 159,164,167,200,201,247, 338
 Fujikawa K. [449,516] 44,45
 Fujinaga M. [1244,1258,3042] 73,74, 77,283
 Fujishiro K. [577] 46
 Fujiwara K. [708,1803,2082,2676] 50, 164,196,250
 Fujiwara T. [614] 47
 Fukasawa K.M. [223,230] 38
 Fukuda E.K. [1458] 106
 Fukuda H. [826] 53
 Fukuda M. [1774,2460] 162,230,231, 232
 Fukumura T. [209] 65
 Fukushima J. [1115] 60
 Fukushima K. [866] 54
 Fulcher I.S. [1150,1151] 61
 Fuller R.S. [583] 46
 Funakoshi T. [247] 38
 Furie B.C. [434] 43
 Furihata C. [835,1694] 53,148
 Furth A.J. [669] 49
 Futrell J.H. [1561] 127
 Gaertner H. [2158] 200
 Galardy R.E. [2622,2871] 247,261
 Galdes A. [2508,3243] 235,236,317
 Galloway W.A. [1141] 61
 Gammon K.L. [3116] 292
 Gandour R.D. [1550] 125
 Garavito R.M. [1357] 94
 Gardell S.J. [938,2135] 55,199
 Garel J.-R. [2307] 217,218,282
 Garesse R. [1698] 148
 Garg G.K. [919] 55
 Garland F. [3003] 277
 Garnier M. [1072] 59
 Garrett E.R. [1590] 132,135
 Gaucher G.M. [381] 42,192,221,234, 235
 Gay N.J. [722] 50
 Gebhard W. [1066] 59
 Gee N.S. [1041,1152] 58,61
 Geiger R. [2216] 208
 Geison M.J. [2098] 198
 Geoghegan K.F. [2509,2996] 235,236, 277
 Georgopapadakou N. [263] 39,254
 Gendry P. [302] 40
 Geratz J.D. [2558] 241,242
 Gerig J.T. [3091,3106,3118,3340, 3358,3359] 286,289,292,336,353
 Gershenfeld H.K. [539] 45
 Gertler A. [1765,1905,2285] 161,165, 167,212
 Gibson D. [290] 39
 Gierasch L.M. [2200] 206
 Gieselmann V. [2258] 210
 Gilles A.-M. [743,744,1336,1334] 50, 89,218,221
 Gillespie R.J. [67] 18
 Gilli G. [42] 14
 Gilliland G.L. [1274] 74
 Gilson M.K. [3164] 305
 Glazer A.N. [163,736,2078,2560,2562, 2566,2935] 32,50,196,242,268
 Glick D.M. [2238,2239] 210
 Gluschkof P. [1181,1182,1902] 62, 167
 Gohda E. [786,787] 51
 Gold A.M. [2649] 248
 Goldberg A.L. [188,362,2925] 41,47, 64,267
 Goldberg G.I. [1130] 61
 Goldberger G. [565] 46
 Goldblum A. [3165] 305,306,310
 Goodford P.J. [3013] 280
 Gorbalenya A.E. [655,816] 48,52,69
 Gorbunoff M.J. [2357] 220
 Gorecki M. [2086] 197,210
 Gorenstein C. [219] 38
 Gorenstein D.G. [2643,2872] 247,261
 Gorter J. [2926] 267
 Gorvel J.P. [983] 57
 Goto S. [2915,2985] 266,278
 Gottesman S. [617] 47
 Gra R. [100] 22
 Graf L. [2099,2126,2952] 198,199,273
 Graham J.E.S. [887] 54
 Gramstad T. [75,82] 20
 Grant D.A.W. [329,1807] 41,164
 Grant G.A. [471,472] 44
 Gratecos D. [289] 39
 Graves D.J. [1951] 173
 Graves M.C. [941] 56
 Gray G.M. [961] 56
 Gray P.J. [2548] 240
 Green G.D.J. [1697] 148
 Green J.D. [1706] 148
 Greene I.G. [2745] 256,257,259
 Greenblatt H.M. [1256] 74
 Greenburg G. [647] 48
 Gregoriou M. [2103] 198,254

- Grieco C. [2007] 183
 Griffith O.W. [3022] 281
 Gripon J.C. [1113] 60
 Grisaro V. [2184] 203
 Grobelny D. [2616,2883,2889,3007] 247,263,280
 Gros C. [971] 56
 Gros P. [3067] 284
 Gross J. [1313] 85
 Groves J.T. [1563,1566,1605] 127, 133,305
 Groutas W.C. [2672,2703] 249,253
 Grunwald E. [2981,3314] 277,331
 Grütter M.G. [3040] 283,290
 Gunsteren W.F.v. [1388] 96
 Gupton B.F. [1784] 162
 Gurd F.R.N. [1377] 96
 Gusek T.W. [382] 42
 Gustafson G.L. [797] 52
 Gutfreund H. [1721] 152,312
 Guthrie J.P. [1525] 117
 Gutman M. [1490] 113
 Gutowsky H.S. [49] 16
 Hagehara B. [176] 37
 Hagemeyer K. [897] 54
 Hagiwara H. [636] 48
 Hagler A.T. [134,136] 28
 Hajdu J. [1374,1547] 96,124
 Halász P. [2342] 220
 Haldane J.B.S. [1744] 157,363
 Haley E.E. [691,692,693] 49
 Halila R. [1175] 61
 Hamilton C.L. [3404] 359
 Hamilton S.E. [3192] 309
 Hammer C.H. [573] 46
 Hammes G.G. [1735,2663,2979,2980] 154,274,275,277
 Hammond G.S. [1531] 120,343
 Hanada K. [2719] 254
 Hancock [1440] 104
 Hangauer D.G. [3316] 332,336,338
 Hansoh C. [119,1971,1973-1975] 26, 178,264
 Hanson H. [954,2179] 56,161,202,222
 Harbenson S.L. [2737] 256
 Harboe M.K. [837] 53,210
 Hardman K.D. [1289] 74
 Hardman M.J. [3151] 305
 Hardy L.W. [2048] 193
 Hardy W.R. [819] 52
 Harned H.S. [2422] 224
 Haroda M. [1900] 167
 Harpel P.C. [2742] 256,257
 Harper C. [1033] 58
 Harper E. [1752] 159
 Harper J.W. [1827] 164,166,194
 Harris E.D. [1129] 60,61
 Harris R.B. [1044,1351,1922] 58,94, 171
 Harrison L.W. [1381,2989] 96,278
 Harrison R.K. [3105] 288
 Hartley B.S. [175,272,499,1683,2101, 2639] 35,39,45,147,198,247
 Hartsuok J.A. [1272,1344,2240] 74, 90,210
 Hase J.I. [197] 64,222
 Hashida S. [2720] 254,256
 Hashimoto H. [2494] 234
 Hashimoto N. [323] 40,43
 Hass G.M. [2753,2825,2840,2841] 256, 258,260
 Hathaway D.R. [2072] 196,209
 Hatcher V.B. [643] 48
 Hatton [97] 22
 Havsteen B.H. [2969] 276
 Hayano T. [2235] 209
 Hayashi H. [791] 52
 Hayashi R. [250,2318] 38,161,164,219
 Hayashi S. [2278] 211
 Haynes R. [2973] 276
 Heckler T.G. [1321] 86
 Hedeager-Sorensen S. [1085] 59
 Hedstrom L. [2699] 252
 Hegazi M.F. [1405] 98,107,184,185, 225,304,325,343
 Heijne G.v. [1854] 165,169,173,206
 Heimbürger N. [2761] 257
 Hein G.E. [1718,2020,2021,3402] 150, 187,359
 Heinemann U. [1266] 74
 Heinrichson R.L. [2817] 258
 Heins J. [1805] 164
 Henderson G. [370] 42
 Henderson R. [1325,1328] 86,87,196, 283,290,307,333,334,335,362
 Hermann R.B. [2943] 271
 Heremans L. [2308] 217
 Hermodson M.A. [296] 40
 Herriott R.M. [2234,2250] 209,210
 Herschlag D. [3407] 365
 Hersh L.B. [1008,1889] 57,167
 Hershko A. [194,1910,1946,1948] 64, 170,173
 Hess G.P. [2305,2982,3293] 217,276, 278,326
 Higashimori K. [2266] 210
 Higashiyama S. [2811] 258
 Higgins D.L. [1938] 172,180
 Higuchi T. [69] 19
 Hill C.R. [1861,1908] 167,169
 Hill R.L. [1739,1954,2570] 156,174, 242
 Hill T.L. [1742] 156
 Hillenbrand E.A. [1492] 114
 Hilvert D. [2117] 198
 Himmelhoch S.R. [950] 56
 Himoe A. [3203] 313
 Hine J. [71,1429] 19,102,305
 Hinkle P.M. [3318] 333
 Hippel P.H.v. [2410,2964] 223,273, 274,349
 Hiraoka B.Y. [683] 49
 Hiriwara H. [2967] 276
 Hiroi Y. [1180] 62
 Hirono S. [3058] 283
 Hirose J. [2420] 224
 Hirose S. [927] 55
 Hirota E. [21] 12,13,14
 Hirota T. [1034] 58
 Hiwasa T. [2802] 258
 Hoare D.G. [3365] 353
 Hoffmann S.J. [3241] 317
 Hofmann T. [252,2334,2526,3104,3240] 39,164,219,235,236,288,296,297,317, 322
 Hofstee B.H.J. [1673] 145
 Hofsteenge J. [2067] 196
 Hofsten B.V. [376] 42
 Hogg J.L. [1505] 115
 Hojima Y. [1176] 61

- Holden H.M. [2728,3086] 256,284,301
 Hollands T.R. [2325,2333,2445] 218, 219,226
 Holleman W.H. [453] 44
 Holley A.D. [1146] 105
 Hollis D.P. [2291] 212
 Holloway M.R. [200] 64
 Holm I. [932] 55
 Holmes M.A. [1293,2695,3261] 74,252, 284,317,319
 Holmes W.E. [2767,2768] 257
 Holmquist B. [2620] 247
 Holzer H. [892,2199] 54,206,222
 Homandberg G.A. [2154,2165,2821, 2842] 200,201,258,260
 Homer R.B. [64] 17,18,19
 Hook V.Y.H. [1080] 59
 Hooper N.M. [989,1215] 57,73
 Horii A. [2774] 257
 Horii T. [652] 48
 Horiike K. [2551] 240
 Horiuchi H. [891] 54
 Hotez P.J. [1170] 61
 Howard A.E. [1544] 123
 Houtard J. [886,1852] 54,165,222, 223
 Hsiung L.-m. [2771] 257
 Hsu I.N. [1276] 74,81
 Hwang B.J. [605,606] 47
 Hwang S.Y. [1707] 148,149
 Huang J.S. [856,2908] 54,266
 Huang T.-H. [1365] 95
 Hubbard C.D. [3281,3320] 325,333
 Huber C.P. [3402] 288,336
 Huber R. [1235,2765,3021,3044] 73, 257,281,283,286,287,289,290,320,322
 Hubert F.M. [2490] 234
 Hulf J.B. [1602] 133
 Huges D.L. [3047] 283
 Hughes D.O. [57] 16
 Hui K.-S. [697,1009] 49,57
 Hunkapiller M.W. [3097,3176,3299] 287,308,326
 Hupe D.J. [1542] 123
 Hurion N. [473,474] 44,160
 Hurst G.H. [1593] 132
 Husain S.S. [726,728,2681,2688] 50, 89,250,251
 Huskey W. [1497] 114
 Hymes A.J. [2555] 241
 Ichihara S. [358] 41
 Ichihara Y. [848] 53
 Idoux J.P. [102,1437] 22,104,105
 Ihara Y. [1634,1636] 138
 Iijima K.-i. [1132] 61
 Iio K. [2740] 256
 Ikeda K. [1455] 105
 Ikemura H. [2202,2227] 207,209
 Ikeno K. [548] 45
 Imai T. [824,2260] 53,210
 Imamura T. [1356] 94
 Imanaka T. [2501] 235
 Imoto T. [1916] 170
 Imperiali B. [2607,2859] 246,261
 Inada Y. [2079] 196,197
 Inagami T. [923,1996,1998,2261, 2423,2905,3213] 55,166,172,183,192, 210,224,225,266,313,325
 Ingles D.W. [55] 19,362
 Innis M.A. [648] 48
 Inouye K. [1767,2595,2604] 161,245, 246,314
 Inward P.W. [3290] 326,333
 Irwin D.M. [319] 40
 Isackson P.J. [1317] 85
 Isemura S. [2801] 258
 Ishida M. [1178] 62
 Ishidoh K. [765] 51
 Ishihara T. [841] 53
 Ishiura S. [610] 47
 Ismail F. [808] 52
 Isowa Y. [2162,2163] 201
 Itakura K. [2106] 198
 Ito Y. [1037] 58
 Itoh N. [454] 44
 Ivanoff L.A. [2130] 199
 Ivanov V.I. [3438] 373,374
 Iwanaga S. [2748] 256
 Iwao H. [926] 55
 Iwayama A. [203] 64
 Jackson R.L. [212] 65
 Jackson W.T. [2187,2337] 203,220
 Jacobs J. [1395] 97
 Jacobs M. [340] 41
 Jacobsen C.F. [2206] 208
 Jacobsen N.E. [2623] 247
 Jacobs-Sturm A. [973] 56
 Jaffé H.H. [1430] 103
 James M.N.G. [1255,1271,1277,1345, 2280,3063, 3065,3071,3072,3129, 3131] 74,90,212,251,284,289,290, 291,292,295,296,302,307,308,309, 310,319,331,332,337
 Janda K.D. [1396] 97
 Janin J. [162] 32
 Jansen E.F. [1308] 85,247
 Janska H. [1714] 148
 Jany K.D. [285,286,311,379,380] 39, 40,42
 Jaurin B. [676] 49
 Jeffrey G.A. [41] 14
 Jeffrey J.J. [1131] 61
 Jencks W.P. [9,1409,1416,1523,1524, 1528,1537,1540,1571,3370] 7,99,100, 117,120,122,128,304,329,349,353,363
 Jenne D. [540,541] 45
 Jennings M.P. [659] 48
 Jenny R.J. [423] 43
 Jensen J.L. [1514] 115
 Jensen T. [853] 53
 Joesten M.D. [83] 20
 Johannin G. [2972,3383] 276,277,355
 Johansen J.T. [1368,1370,1756,3140, 3171] 96,160,300,305
 Johansson A. [79] 20
 Johnson B.A. [1801] 163
 Johnson D.M.A. [567,570] 46
 Johnson E.K. [1834] 164
 Johnson F.A. [2347] 220,305
 Johnson L.A. [520,2659] 45,248
 Johnson P. [2312] 219
 Jönsson A.G. [397] 43
 Jordan F. [3162] 305
 Jorgensen W.L. [56,88,89] 16,21
 Joris B. [260,675,1074] 39,49,59
 Jupp R.A. [2727] 255
 Jurešák L. [771] 42

- Kafotos F.C. [312] 40
 Kageyama T. [790,839,840,867,2243,2244,2247] 52,53,54,210
 Kahana L. [2415] 223
 Kahne D. [1425] 101
 Kaise H. [2738] 256
 Kaiser B.L. [2446] 226
 Kaiser E.T. [3251] 318
 Kallos J. [2567] 242
 Kam C.-M. [1793,2701,2978] 163,253,276
 Kamphuis I.G. [1262,1263] 74,79
 Kane W.H. [422] 43
 Kaneda M. [436,1315] 44,85,234
 Kania R.K. [1890] 167
 Kanost M.R. [2773] 257
 Kaplan H. [1875] 167
 Kapune A. [2148] 200
 Karasaki Y. [2045] 192
 Kärger H.-J. [1757] 160
 Karplus M. [1387] 96
 Karve D.D. [1453] 105
 Kasahara Y. [2220] 208
 Kasai S. [467] 44
 Kasserra H.P. [2316] 219
 Katayama K. [1179] 62
 Katayama Y. [607] 47
 Kato H. [549] 45
 Kato Y. [2853] 261,262
 Katoh I. [2730] 256
 Katritzky A.R. [65] 17,18
 Kattner C. [2638] 247
 Katunuma N. [2733] 256
 Katz B.A. [2113] 198
 Kawabata S.-i. [1711] 148
 Kawamura Y. [237] 38
 Kawasaki H. [2816] 258
 Kawata S. [682,1021] 49,57,164,223
 Kay J. [2242,2729] 210,256
 Keil-Dhouha V. [1134] 61
 Keilová H. [1759,1780] 160,162
 Keleti T. [1720] 151
 Keller P.J. [2269] 211
 Kellermann J. [2812] 258,259
 Kelly J.A. [1260,3088] 74,78,197,285
 Kennedy W.P. [3294] 326
 Kenner G.W. [1779] 162
 Kenny A.J. [1185] 62
 Kenny J. [222] 38,164
 Kerfelec B. [503] 45,211
 Kershner K.D. [1536] 122
 Kessler E. [1016] 57
 Kester W.R. [1292,3083] 74,82,284,301
 Kettner C.A. [2657,2852,2861] 248,261,262,263
 Keung W.-M. [1769] 161,164
 Kézdy F.J. [3200-3202] 313
 Khan I.U. [739] 50
 Kido H. [525,527] 45
 Kiener P.A. [2854] 262
 Kikuchi M. [227,825,1192] 38,53,62
 Kikuno Y. [485] 44
 Killian F.L. [1609] 134
 Kim H. [3081] 284,298,301
 Kim J.K. [1459] 106
 Kim S.-J. [2263] 210
 Kim Y.S. [960] 56
 Kimmel J.R. [1331] 89,209
 Kimura M. [23] 13
 King G.F. [2631] 247
 King E.L. [1668] 144
 King M.M. [1620] 135
 King S.W. [1785] 162
 Kirby A.J. [1499,1583,1585,1595] 114,130,132,135
 Kirsch J.F. [1580] 130
 Kirschke H. [755,784,785,2680] 51,250
 Kirschner R. [1166] 61
 Kiselev N.A. [1305] 84
 Kisiel W. [418,429,452] 43,44
 Kitagishi K. [2977,2990,2991] 276,278
 Kitaguchi H. [2160] 200
 Kitahara A. [770] 51
 Kitson D.H. [3037] 282
 Kitson T.M. [2175,2360,2586,3219] 201,220,243,314
 Kitz R. [2546] 240
 Klein I.B. [2232] 209
 Kleine R. [394] 43,234
 Klinman J.P. [1503] 114
 Klotz I.M. [77,1641,1641,1642] 20,138,237
 Kluger R. [1596,1597] 132
 Knisatschek H. [441] 44
 Knorre D.G. [2999] 277
 Knott-Hunziker V. [671,1319] 49,86,3342,3348
 Knowles J.R. [1627,1962,2299,2338,3342,3348] 137,177,189,215,220,245,338,349,371,372,378
 Knudson S.K. [1456] 106
 Kobayashi K. [266] 39
 Koeppe R.E. [2355] 220,305
 Koetzle T.F. [32] 14
 Kogan R.L. [1968] 178
 Köhle D. [635] 48
 Kohno H. [1020] 57
 Kohno M. [1189] 62
 Koide A. [276,278] 39,221
 Koide Y. [352] 41
 Kokotos G. [1708] 148
 Kolaskar A.S. [35,43] 14,15
 Kominami E. [578,2799] 46,258
 Komiyama M. [1501,1506,1581,1582,1610] 114,115,130,134,326
 König H. [818] 52
 Konopinska D. [2149] 200
 Kopp F. [1298] 78
 Kopple K.D. [142] 29
 Kordel W. [820,821] 52
 Koren R. [2971] 276
 Kornfeld S.J. [1174] 61
 Kortt A.A. [2320] 219
 Koshland D.E. [1615,3019,3352,3353,3406,3408] 134,135,281,351,352,355,364,365
 Kosman D.J. [2292] 212,291
 Kosiakoff A.A. [1237,3182] 73,309
 Kostka V. [2245] 210
 Kotler M. [1838,1887] 165,167
 Kovach I.M. [2642] 247
 Kovaleva G.G. [881,882] 54
 Kowlessur D. [2031] 188,225
 Kozlov L.V. [2008] 183
 Kramer G. [1359] 94
 Kramer K.J. [1312] 85
 Krausslich H.-G. [654,1839] 48,52,165,173

- Kraut J. [3146] 304
 Krebs H.A. [2397] 222
 Kreil G. [1198] 65
 Kreissler M.A. [143] 29,273,287
 Kresge A.J. [1504,1511,2438] 115,
 226,335
 Krishnaswamy S. [2215] 208
 Krishtalik L.I. [3384,3385] 356,358,
 371
 Kroll H. [1553] 126,127
 Kvamme E. [2920,2921] 267
 Kwon S.T. [385,386] 42
 Kuhn R.W. [249] 38
 Kullmann W. [2161] 201
 Kumagai I. [883] 54
 Kumamoto K. [253] 39
 Kumamoto T. [1164] 61
 Kumar P.M. [2249,2251] 210
 Kumar R.S. [1051] 58
 Kumatori A. [615] 47
 Kumon A. [1026] 58
 Kundu A.K. [2489] 234
 Kunimoto S. [2723] 255
 Kunitake T. [1584,1643] 130,138
 Kunugi S. [1800,2044,2456,2472] 163,
 170,192,230,232
 Kunze N. [1025] 58
 Kuo L.C. [3246,3262] 317,319
 Kuramochi H. [2986] 278
 Kurecki T. [1092] 60
 Kurland R.J. [29] 14
 Kuroda K. [1806] 164,167
 Kuromizu K. [1705] 148
 Kurz L.C. [3391,3392] 357
 Kutzbach C. [667] 49
 Kuwabara S. [1193] 62
 Laber B. [2804] 258
 LaBombardi V.J. [542] 45
 Lachman H. [3207] 313
 Lacko A.G. [303] 40,211
 Ladell J. [22] 13
 Laidler K.J. [2424,2451] 224,228,349
 Lakowicz J.R. [167] 32
 Lалу K. [976,980] 56
 Lam C.H. [1500] 114,328
 Lambris J.D. [574] 46
 Landis B.H. [3113,3114] 291
 Lands W.E.M. [1794] 163
 Landsperger W.J. [1137] 61
 Langenbeck W. [1575] 129
 Langer J. [593,594] 46
 Lanzillo J.J. [1046] 58
 Largam C. [495] 45
 Larimore F.S. [602] 47
 Lasch J. [988,1751,2396] 57,159,222
 Laskowski M. [2711,2749] 254,256,
 257,259
 Latt S.A. [1690,2389] 148,222,243
 Laura R. [2650] 248
 Laurence C. [116] 25
 Law J.H. [284] 39,40
 Lawson W.B. [2671,3152] 249,305,309
 Lazdunski C. [1001] 57
 Lazure C. [487] 45
 Leary R. [2675] 250
 Leatherbarrow R.J. [1307] 85
 Leckie B.J. [2265] 210
 Leoroisey A. [400,585,586,1133,1314]
 43,46,61,85,162
 Ledeme N. [952] 56
 Lee C.C.T. [1014] 57
 Lee C.-M. [220,1161] 38,61
 Lee I.S. [1118] 60
 Leger R.J.S. [389] 42
 Legrand Y. [642] 48
 Lehn J.M. [1472,1473,1520] 109,115
 Lehrmann G. [3304] 326
 Lejczak B. [2630] 247
 Lenney J.F. [1024,1027,1039,2798,
 2806] 57,58,164,258
 Leo A. [2942] 271
 Lepage T. [598] 47
 Lerner R.A. [1400] 97
 Lesk A.M. [155,3023] 30,281
 Lestienne P. [2605,2898] 246,265
 LeTrong H. [523] 45
 Letsinger R.L. [1639] 138
 Levinson P.R. [1870] 167
 Levitt M. [27,90,152,165,2940] 13,
 21,29,30,31,32,270
 Levy C.C. [1069,1070] 59
 Levy M.R. [546,907] 45,54
 Lewis C.A. [2869] 261
 Lewis S.D. [3159,3169] 305
 Leytus S.P. [557,628,1686,2547] 46,
 47,147,240
 Liang T.-C. [2610,2888] 246,263
 Liao J.C.R. [788] 51
 Lide D.R. [25] 13
 Lieberman J.F. [111] 24
 Liener J.E. [727] 50
 Lienhard G.E. [1535,2845] 122,260
 Liepnieks J.J. [330] 41
 Lifson S. [63] 17,20
 Light A. [1921,2070] 171,196
 Lin L.-N. [2033,2034,2036] 188
 Lin S.H. [2527] 235,236
 Lin T.-Y. [2601,2927] 245,267
 Lin W.-Y. [2529] 235,236
 Lin X.-l. [905,2236] 55,209
 Linderstrom-Lang K.U. [1914,1919]
 170,171
 Lindquist R.N. [2849] 261,262
 Lineweaver H. [1672] 144,145
 Lipperrheide C. [702] 50
 Lipscomb W.N. [1371,3134,3138,3139]
 96,298,299,300,332,344
 Little G.H. [1018] 57
 Livingston D.C. [1685] 147
 Liu C.Y. [2471] 232
 Liu T.-Y. [745,746] 50,209
 Llorens C. [2600] 245
 Lo S.-S. [2230] 209
 Lobb R.R. [2635,2993] 247,277
 Lobe C.G. [538] 45
 Lobo A.P. [1862] 167
 Lockau W. [392] 43
 Loebmann H. [2764] 257
 Loftfield R.B. [3377] 355
 Loh Y.P. [914,2100] 55,198
 Lonsdaleborough J. [2463] 229,231
 Lones M. [701] 50
 Long G.L. [430,2763] 43,257
 Lonsdale-Eccles J.D. [1865,2061,
 2062] 167,188,195
 Lottenberg R. [1809,1812] 164,165
 Lovrien R. [3388] 357
 Low P.S. [3375,3376] 355
 Lowbridge J. [1819] 164,167,192
 Lowe G. [1333,1786,3123] 89,162,294
 Lucas E.C. [3283] 325

- Ludewig M. [2395] 222
 Lumry R. [2449,2476] 227,230,232, 233,363
 Lundblad R.L. [313,1343] 40,90,164, 251,306
 Lundren S. [641] 48
 .
 Lundwall A. [486] 44
 Lynn K.R. [623,624,696,740] 47,49, 50
 MacGillivray R.T.A. [318] 40
 MacGregor R.R. [714] 50
 Machleidt W. [2805] 258
 Machuda E.J. [959] 56
 MacKay V.L. [912] 55
 MacKenzie N.E. [2535,2885] 236,263
 MacNair R.D.C. [226] 38
 Madison V. [130] 28
 Madura J.D. [3373] 354
 Maehler R. [2984] 278
 Maggiora G.M. [1468] 108
 Magni G. [894] 54
 Magnusson S. [317] 40,73,208
 Maier M. [1941] 172
 Maita T. [660,911] 48,55
 Makimoto S. [2473] 232
 Makinen K.K. [681] 49
 Makinen M.W. [2523,3206,3245] 235, 313,317
 .
 Mäkinen P.-L. [1122] 60
 Malfroy B. [1153,1155,1156,1850] 61, 165
 Malik M.N. [768,774] 51
 Malinowski D.P. [326] 40
 Malliok J.M. [1607] 133
 Mallory P.A. [502] 45
 Malthouse J. [2352,2517,3208,3305] 220,235,313,326,328
 Mandle R. [479] 44
 Mann K.G. [315] 40
 Mannervik B. [1676] 145
 Manser E. [1076] 59
 Mantle D. [680,972] 49,56
 Mao B. [3268] 320
 Mao S.-J.T. [2781,2782] 257
 Marcinişzyn J.P. [2248,2725,2895] 210,255,256,263,264
 Marcus R.A. [3426] 371
 Mareš M. [2824] 258
 Mares-Guia M. [2427,2470] 225,232, 280
 Margolin A.L. [1772] 161
 Margolis H.C. [2096] 198
 Marini J.L. [3028] 282,328
 Marinkovic D.V. [1059] 59
 Markel J.R. [1015] 57
 Markland F.S. [343,455] 41,44
 Markley J.L. [2348,3158,3303] 220, 305,308,326
 Marks N. [1797] 163
 Marlier J.F. [1517] 115
 Marossy K. [414,1960] 43,177
 Maroux S. [1206,1942,2936] 66,172, 268
 Marquart M. [3045] 283,287,288,322
 Marsh H.C. [1867] 167,172
 Marshall A.G. [3357] 353
 Marshall T.H. [1983,2459] 180,230
 Martin C.J. [2578,2929] 243,268
 Martin G.J. [52] 15
 Martin P. [1832,2057] 164,194
 Martin R.B. [1560,2372,2411,2412] 127,221,223
 Martinek K. [1424,1629,1631,1726, 1992,2155] 101,137,138,153,182,200, 229,236
 Martinez M.C. [2272] 211
 Martino G.N.D. [189] 64
 Masaki T. [587] 46,160
 Mason A.J. [490] 45
 Mason R.W. [753,757,2437] 51,226
 Masson D. [535] 45
 Matagne A. [1857] 166
 Matchinson C. [2115] 198
 Matheja J. [2203] 207
 Matheson N.R. [2762] 257
 Matsas R. [488,1898] 45,167
 Matsubara H. [347,365,1102] 41,42, 60,234
 Matsuda K. [235,1892] 38,167,221
 Matsumoto J. [827] 53
 Matsumoto K. [2735] 256,284,293,294
 Matsuoka Y. [277] 39
 Matsuzawa H. [384] 42
 Matteson D.S. [2850] 261,262
 Matthews B.W. [125,1220,1291,1363, 2393] 28,73,74,83,95,222,262
 Matthews D.A. [1249,2875] 74,77,284, 308
 Matthews W. [1949] 173
 Mattis J.A. [1820,2886] 164,167,263, 278
 Matyska L. [1677] 145
 Maurel P. [2431] 225
 May S.W. [3250] 318
 Mayer H. [1030] 58,164
 Mayer R.J. [1912] 170,173
 Maze M. [984] 57
 Maziak L. [1901] 167,170
 McCaman M.T. [1002,1004,2127] 57, 199,210
 McCammon J.A. [1384] 96
 McClelland R.A. [1479,1513] 111,115
 McClure W.O. [2582] 243
 McConn J.D. [2486,2576] 234,243
 McDonald J.K. [182,213,231,695,2403] 37,38,49,159,223
 McDowall M.A. [751] 51
 McDonald R.J. [497] 45
 McEntee K. [650] 48
 McFarlane N.D. [1770] 161
 McGrogan M. [2788] 257
 McGuire M.J. [810,812,813] 52
 McKay T.J. [2046,2590] 192,244
 McKenzie R.A. [793] 52
 McKerrow J.H. [514] 45
 McKoron M.M. [2716] 254
 McMullen B.A. [518] 45
 McMurray J.S. [2665] 249
 McMurry J.E. [2739] 256
 McPhalen C.A. [2790,3057,3107] 257, 283,288,289
 McRae B.J. [1791,1814,2058] 163,164, 194
 McWherter C.A. [2791] 258
 Medzihradsky K. [1878] 167,168,190, 192,218,280
 Meek T.D. [1304] 82
 Mehlich A. [1687] 147
 Meier M. [533] 45

- Melander L. [1464] 107
 Melloni E. [2388] 222
 Meloun B. [273,396,723] 39,43,50
 Menegatti E. [3009] 280
 Menéndez-Arias L. [2499] 235
 Menger F.M. [1444,1599,1622,1637,1654,3360,3361] 104,133,136,138,140,353
 Mentlein R. [1923] 171
 Meot-Ner M. [3381] 355,356
 Meriwether L. [1570] 128,192
 Merrett T.R. [842] 53
 Metrione R.M. [729,1209] 50,69
 Metz G. [957] 56,223,267
 Meyer E.F. [1241,3048,3050] 73,283
 Mézes P.S.F. [673] 49
 Michaelis L. [1662] 142
 Migliorini M. [2361] 220
 Mihalyi E. [1909] 170,171,172
 Mikeš O. [295,367] 40,42
 Mikola L. [238] 38
 Mikuni-Takagaki Y. [1139] 61
 Miles E.W. [1952] 173
 Miles J.L. [2413] 223,241
 Miller A.R. [1466] 108
 Miller C. [998] 57
 Miller M. [1284] 74
 Milstein J.B. [1967] 178,335
 Milstein S. [1618] 135
 Min H.Y. [544] 45
 Minamiura N. [849] 53
 Minor S.S. [3274] 323
 Mishra A.K. [3287] 325
 Misono K.S. [929] 55
 Miura S. [1163] 61
 Miyake M. [1191] 62
 Miyata K. [1117] 60
 Miyazaki H. [930] 55
 Mizuno K. [582,584,777] 46,51
 Mizusaki K. [3090] 286
 Mizushima S. [59] 16
 Mizutani S. [775] 51
 Mobashery S. [2706] 253
 Mook W.L. [3136,3137,3154,3156] 299,305,311,332
 Möckel W. [281] 39
 Moehle C.M. [575] 46
 Moews P.C. [1261] 74
 Moffitt M.J. [2015] 185
 Mole J.E. [571,2321] 46,219
 Molla A. [796] 52
 Mollay C. [215] 38
 Momany F.A. [62] 17,20
 Monzingo A.F. [3087] 284,288,301
 Mookhtiar K.A. [1849,2890] 164,263
 Morales T.I. [802] 52
 Morawetz H. [1408] 100,101
 Morgan J.G. [686] 49
 Morgan P.H. [2219,2284] 208,212,248
 Morgan R.S. [3089] 285
 Morihara K. [588,910,1114,1116,1831,1846,1876,1888,1903,1904,2053,2138,2166,2173] 46,55,60,164,165,167,188,194,200,201,202,338
 Moriyama A. [440] 44
 Mort J.S. [719] 50
 Moss R.A. [1633] 138
 Movat H.Z. [2217] 208
 Moulton J. [1254] 74,87
 Moulder L.A. [2641] 247
 Mous J. [2131] 199
 Mozhaev V.V. [2092] 197
 Mullen G.P. [3324] 334
 Müller M. [2226] 209
 Müller-Frohne M. [2330] 219
 Müller-Esterl W. [2794] 258
 Müller-Eberhard H.J. [555] 46
 Mumford R. [1149] 61
 Murachi T. [730,2309] 50,218,282
 Murai H. [2826] 258
 Murakami Y. [1635] 138
 Murdock J.R. [1467,1509] 108,115
 Murphy G. [1147] 61
 Murphy J. [2603] 245
 Muto N. [863,868,869] 54
 Na K.-J. [2923] 267
 Nagakura S. [50] 15,16
 Nagase H. [481] 44
 Nagatsu I. [979] 56,222
 Nagendra K. [2288] 212
 Nakagawa S. [3135,3190] 299,302,309,356,368
 Nakagawa Y. [1324,3221] 86,196,314,318
 Nakahama K. [1119] 60
 Nakajima K. [2055] 194
 Nakajima M. [1111] 60
 Nakamura T. [432,3319] 43,333
 Nakanishi K. [2145] 200
 Nakanishi M. [968] 56
 Nakashima H. [154] 30
 Nakatani H. [2864,2880,2894,2997,3027] 261,262,263,277,278,282
 Nakatsuka T. [2150] 200
 Nakayama H. [3334] 336
 Nakayama S.-i. [1338,1339,2690] 90,251
 Nakayama T. [2559] 241
 Nakon R. [1562] 127
 Nam S.H. [943] 56
 Narahashi Y. [369,372,1083] 42,59,164
 Náray-Szabó G. [3012] 280
 Nardacci N.J. [267] 39
 Naruto S. [2704] 253
 Nashed N.T. [2193,2194] 204
 Natarajan S. [2615] 247
 Navia N.A. [1285,3051] 74,283,288,292
 Nau H. [3236] 317
 Nauhton M.A. [1311,1755] 85,160
 Nedkov P. [349] 41
 Neet K.E. [2918] 267
 Némethy G. [124,135,2941,2956] 27,28,29,271,274
 Nesheim M.E. [2634] 247
 Nethery A. [1140] 61
 Newman M.S. [1441] 104
 Newmark A.K. [2177] 201,314,338,340
 Newmark R.A. [147] 29,30
 Newport C.R. [515] 45
 Neuman R.C. [46,86] 16,20
 Neumann H. [2168] 201
 Neurath H. [4,1201,2197,2204] 6,65,206,207,211

- Neussdoerfer F. [893] 54
 Nichol L.W. [2580] 243
 Nicholson E.M. [2346] 220
 Nickerson W.J. [210] 65
 Niemann C. [3403] 359,361
 Niemann M.A. [569] 46
 Nikawa T. [2833] 260
 Nilsson T. [2988] 278
 Nimmo I.A. [1674] 145
 Ninjoor V. [700] 50
 Ninomiya K. [679] 49
 Nishimura K. [1049] 58
 Nishino N. [2619] 247
 Nishino T. [2180] 202,313
 Njieha F.K. [1177] 62
 Nolan C. [450] 44
 Nomoto M. [2365] 221
 Nomura K. [1804] 164
 Nordwig A. [800] 52
 Northrop D.B. [2442] 226
 Northrop J.H. [2477] 233
 Novotný J. [1930] 171
 Nutt E. [2786] 257
 Nyberg F. [633,1007] 57
 Ocain T.D. [2625] 247
 O'Connor B. [1087] 59
 O'Connor C.J. [1403,1638] 98,138
 Oda K. [909] 55,256
 Oday C.E. [254] 39
 Oettgen H.C. [955] 56
 Ogasahara K. [1927] 171
 Ogata S. [228] 38
 O'Gorman J.M. [114] 24,25
 Ogston A.G. [3399] 359
 Ogura Y. [2050] 194
 Ohno M. [1778] 162
 Ohno S. [772] 51,69,194
 Oikawa T. [859] 54
 Oka T. [2142]
 Okada Y. [1144,2602] 61,245
 Okahata Y. [1632] 138
 Okano K. [512,513] 45
 Okitani A. [756,806,2385] 51,52,222
 Okuda M. [2632] 247
 Olaitan S.A. [348] 41
 O'Leary M.H. [1516,3284,3285,3289] 115,325
 Oliver C.N. [1390] 97
 Olsen B.R. [2922] 267
 Olsen J. [965] 56
 Olson M.O.J. [338] 41
 Olstein A.D. [716] 50
 Ondetti M.A. [2621] 247
 Ong E.B. [2660,2686] 248,251
 Ooi T. [146] 29
 Oosterbaun R.A. [1310] 85
 Orlowski M. [644,1159] 48,61
 Orthner C.L. [451] 44
 Osada H. [829] 53
 Oshima G. [2405] 223
 Ota S. [731] 50
 Otsuka Y. [2386] 222
 Ott H. [1483] 111
 Ottesen M. [342,899] 41,54
 Ötvös L. [1891] 167
 Overberger C.G. [1606] 133
 Faberit M. [3337] 336
 Pacaud M. [353-356,360] 41
 Page M.I. [106,1616,1617,3346,3347,3351] 23,134,135,349,352,353,354
 Pal G. [733] 50
 Palmer S.M. [359] 41
 Pandya B.V. [459] 44
 Paneth P. [1510] 115
 Pank M. [1982] 180
 Pantoliano M.W. [2121] 198,199
 Papaioannou S. [2930] 268
 Paramokos E. [3109] 290
 Parish D.C. [915] 55
 Parker A.J. [3371] 354
 Parker J.M. [122] 26
 Parker L. [1997] 183
 Parkes C.O. [2208] 208
 Pattabiraman T.N. [2025] 187
 Patterson E.K. [1035,1036] 58
 Paul G. [3239] 317
 Pauling L. [14,99,2843] 11,15,16,22,23,260,363
 Pauptit R.A. [1294] 74
 Pearl L.H. [939,3103,3194] 56,71,82,288,310,322
 Pechik I.V. [1347] 89,92
 Pedersen V.B. [2065] 195,210
 Pedone C. [31] 14
 Pelton J.T. [2658] 248
 Peng Q. [2537] 236
 Penny G.S. [2663] 249
 Perkins H.R. [2181,3026] 202,282
 Perlman D. [1943] 173
 Ferricaudet M. [113] 24
 Perrin C.L. [1522] 115
 Perutz M.F. [2496] 235
 Pesquero J.L. [1869] 167
 Peters D. [37,137,141] 14,28,29
 Petersen T.E. [325] 40
 Peterson L.M. [1054] 58
 Petkov D.D. [2002,2139,3313] 183,200,329
 Petsko G.A. [2533] 236
 Pettersson G. [2303] 217
 Pfeleiderer G. [309,1088] 40,59
 Pfuetzner R.A. [2593] 245
 Phelps D.J. [3326] 334
 Philipp M. [2001,2047,2084,2851] 183,193,197,261,262,276
 Phillips D.C. [3386] 356
 Pichová I. [2246] 210,211
 Pickersgill R.W. [3126] 295
 Pillai S. [2911,2912] 266
 Pimental G.C. [72] 19,272
 Pirkle H. [456,622] 44,47
 Piszkiwicz D. [1389] 97
 Plattner J.J. [2611] 246
 Platzner K.E.B. [133,3011] 28,280
 Plese P.C. [2063] 195
 Plummer T.H. [1064,2591] 59,164,244
 Plutzky J. [431] 43
 Poe M. [537,621] 45,47
 Pohl J. [1703,3005] 148,280,297
 Poland D. [60] 17
 Polgar L. [738,1790,2019,2083,2363,3148,3310,3315] 50,163,186,197,220,230,304,328,332
 Pollack R.M. [1478] 110
 Pollack S.J. [1394,1399] 97
 Pollack E. [2439] 226,227,335
 Ponnuswamy P.K. [158] 31
 Pontremoli S. [769,933,2387] 51,55,

- 222
 Popov E.M. [61] 17,18,25
 Port G.N.J. [3369] 353
 Porter R.R. [553,559] 46
 Portnoy D.A. [781] 51
 Porubcan M.A. [3160] 305,328
 Poulos T.I. [3061] 284,288,290
 Powers J.C. [1783,1829,1956,2654]
 162,164,174,176,194,248
 Pozsgay M. [1958,1959,1961] 177
 Pracejus H. [1449] 105
 Prael J.W. [1061,2209] 59,208
 Pratt A.G. [1029] 58
 Pratt R.E. [2069] 196
 Prescott J.M. [992,1127,2095] 57,60,
 197
 Price F.P. [1454] 105
 Primrose W.V. [3161] 305
 Puizdar V. [2256] 210

 Quast U. [2970] 276
 Quinn D.M. [2440,2447] 226
 Quinto C. [2275] 211
 Quicocho F.A. [149] 29,74,84,92,93,
 299,332

 Rabier D. [1013] 57
 Radcliff R. [416] 43
 Radhakrishnan R. [3049] 283,288,290
 Radom L. [3196] 311
 Rajagopalan T.G. [2685] 251
 Rajender S. [2454,2461] 229,230,231,
 346
 Raju E.V. [3004] 279
 Ramachandran G.N. [11,16,30,33,150]
 11,12,14,27,28,29
 Rao C.N.R. [54] 16
 Rao S.N. [1448] 105
 Rao S.R. [109] 23
 Rappaport H.P. [350] 41
 Rashin A.A. [161] 32
 Rasmussen J.R. [3215] 313
 Rasnick D. [2668,2694] 249,251
 Rawitscher M. [1422] 101
 Rauber P. [2669] 249
 Ray W.J. [2549] 240
 Raymond M.N. [1879] 167
 Read R.J. [1247,3066] 73,284,286,
 288,290
 Rechsteiner M. [2] 6
 Rees D.C. [1287,1288,3082,3142,3195]
 74,284,299,310
 Regnier P. [357] 41
 Reichelt D. [1760] 160
 Reichmann L. [2144,2152] 200
 Reid K.S.C. [2957] 274
 Reitz M.S. [822] 53
 Relton J.M. [1160] 61,326,328
 Remington S.J. [1245] 73,77
 Remy M.H. [2091] 197
 Renard M. [2297] 214,216,276
 Renaud A. [1872,2656] 167,248
 Reslow M. [2157] 200
 Reuben J. [3356] 353
 Reynolds D.S. [1056] 59
 Rholam M. [1925] 171
 Riberio A.A. [1382] 96
 Rich D.H. [2724,2726] 255,256,264
 Richards A.D. [2731] 256
 Richards J.H. [1463] 107
 Richarz R. [2832] 260,287

 Riddles P.W. [3321] 333
 Riekkinen P.J. [545] 45
 Ringe D. [2700] 253,283
 Riordan J.F. [1369] 96
 Rippon J.W. [1136] 61
 Ritchie C.D. [1434] 104
 Ritonja A. [732,754,710,2787,2803,
 2808] 50,51,257,258
 Riva S. [2159] 200
 Rivett A.J. [196,809] 52,64
 Rizzo V. [131] 28
 Robbins K.C. [324] 40
 Roberts J.D. [948,3193] 56,309
 Roberts J.W. [651] 48
 Roberts N.B. [831,871] 53,54
 Robertus J.D. [1330,3060] 87,88,283,
 288,289,290,322,368
 Robillard G. [2349,3157] 220,305,308
 Robin M.B. [12] 11,12,15,17
 Robinson C. [1187] 62
 Robinson J.R. [1442] 104
 Quinn N.C. [2060] 195
 Robison D.J. [322] 40
 Roderick S.L. [2629] 247,284
 Rodier F.J.L. [2983] 278
 Rodionov M.A. [1929] 171,190
 Rodrigo I. [922] 55
 Rodriguez C. [1078] 59
 Roffman S. [1689] 148
 Rogers G.A. [1482] 111
 Rogers J.A. [1200] 65
 Rogers J.C. [789] 52
 Rogers M.T. [47] 16
 Raghavan N.V. [1223] 73

 Röhm K.-H. [2924,3237,3238] 267,317
 Rohrbach M.S. [1050] 58
 Rohrlisch S.T. [2807] 258
 Roncari G. [1011] 57,198,234,235
 Roodyn D.B. [1688] 148
 Rose G.D. [159] 31
 Roseman J.E. [1110] 60
 Roseman M.A. [123] 27
 Rosenberry T. [2998] 277
 Ross P.D. [3008] 280
 Ross W.C.J. [2692] 251
 Rossi G.L. [1361] 95
 Rossier J. [1713] 148
 Rossky P.J. [145] 29
 Rossman M.G. [126] 28
 Rotanova T.V. [2862] 261,264
 Rothe W. [1094] 60
 Rovey M. [2210] 208
 Rowan A.D. [734] 50
 Royer G. [2416] 224
 Rubin H. [2766] 257
 Rubin J. [2950] 272

 Rücher R. [896] 54
 Ruenwongsa P. [876] 54
 Ruffin P. [993] 57

 Rühlmann A. [3043] 283,287,288,289,
 290
 Rumsh L.D. [1775] 162,188
 Rupnow J.H. [442] 44
 Russell A.J. [2435] 225
 Ryan C.A. [279] 39,40

 Ryden A.C. [401] 43
 Ryle A.P. [834,847,1758,2056] 53,
 160,194

- Sach L. [978] 56
 Sachdev G.P. [1691,2976] 148,276,
 277,340
 Saini P.K. [749] 51
 Saison M. [221] 38
 Saitoh Y. [613] 47
 Sakiyama F. [2351] 220
 Saklatvala J. [599] 47
 Sakurai T. [2032] 188,225
 ~
 Sali A. [3073] 284,287,295,296,297,
 298,319
 Salvesen G.S. [412,2224,2810,2834]
 43,209,258,260
 Samarel A.M. [2257] 210
 Sampaio C. [478] 44
 Sampath-Kumar P.S. [1880] 167
 Sanada Y. [576] 46
 Sander E.G. [1418] 100
 Sander M.E. [2524] 235,236
 Sanny C.G. [2241] 210
 Sapru Z.Z. [458] 44
 Sasaki T. [1821] 164
 Sato S. [2760] 257
 Satoh M. [632] 48,164
 Saus J. [1145] 61
 Sawada H. [306,307] 40,41
 Sawyer C.B. [1515] 115,325
 Sawyer L. [1240] 73,77,307
 Sayre L.M. [1557] 127
 Scarsdale J.N. [28] 13,14,28
 Scotland G. [1460,2962] 106,274
 Schack P. [2319] 219
 Schaffer N.K. [1309] 85
 Schaller J. [464] 44
 ~
 Schär H.P. [1190] 62
 Schechter J. [1745,2899] 158,163,
 164,265
 Scheider W. [3002] 277
 Scheiner S. [1491,3187,3253,3276]
 114,309,318,323
 Schellenberger V. [1874] 167
 Schenkein D.P. [2674] 249
 Schepartz A. [1604] 133
 Scheule R.K. [1385,3034] 96,282
 Schiessler H. [2744] 256,257
 Schindler M. [3387] 356
 Schleuning W.-D. [334]
 Schmid M.F. [1290] 74
 Schmid P.C. [828] 53
 Schmidt P.G. [3132,3296] 297,326
 Schneider F. [1574,1598] 129,131
 Schoellmann G. [1323] 86
 Schoelten J.D. [3179] 308
 ~
 Schönberger Ö.L. [264] 39
 Schowen R.L. [1530,2436,2948,3178,
 3273] 120,225,272,308,323,335
 Schreier E. [2484] 235
 Schroeder D.D. [292] 40,66,196,268
 Schuber F. [3001] 277
 Schulz G.E. [13] 11,27,28,31
 Schultz R.M. [2469,3016] 231,281,302
 Schulze I.T. [1950] 173
 Schwartz H.M. [2024] 187
 Schwartz L.B. [529] 45
 Schwartz T.W. [1816] 164,171
 Schwartz W.N. [764] 51
 Scott C.F. [480] 44
 Souley M.J. [2542] 239
 Sealok R.W. [2164] 201
 ~
 Sebtı S.M. [684] 49
 Sedláček J. [947] 56
 Seelmeier S. [940] 56
 Seely J.H. [1762] 161
 ~
 Seemüller U. [2755] 256,257
 Segal D.M. [1364,2673] 95,249
 Segel I.H. [1655] 141
 Seifter S. [1095] 60,61,222
 Seltzer J.L. [1138] 61
 Semeeckens S.P. [580] 46
 Semenza G. [1028] 58
 Senti F. [24] 13
 Seol J.H. [2573] 243
 Sepulveda P. [838] 53,73
 Seydoux F. [1978,2906] 179,266
 Shah D.O. [3099] 288
 Shai S.-Y. [552] 46
 Shaked Z. [2345] 220,305
 Sham H.L. [2609] 246
 ~
 Shannon J.D. [1090] 59
 Shapiro R. [2404,2406] 223
 Sharma K.K. [1022] 57
 Sharma M. [1052] 58
 Sharma S.K. [1205,2207] 66,208
 Sharon N. [2183] 203
 Shaw E. [2545,2637,2652,2664,2684]
 240,247,248,249,250,257
 Shefer E. [3147] 304
 Shemyakin M.M. [1484] 111
 Shen W.-P. [506] 45
 Shenvi A.B. [2856] 262
 Shewale J.G. [862] 54
 Shiao D.D.F. [2301,2467,2468] 215,
 231,264,280
 Shieh T.-C. [461,462] 44
 Shimizu T. [2391] 222
 Shimotohno K. [944] 56
 Shinagawa T. [807,931] 52,55
 Shinano S. [918] 55
 Shirasu Y. [505] 45
 Shoer R. [344] 41
 Shoham G. [3080] 284,288
 Shoji S. [248] 38
 Shorter J. [1433] 103,104
 Shotton D.M. [496,3108] 289
 Shroyer L.A. [792] 52
 Shu Y.-Y. [460] 44
 Sielecki A.R. [1253,1270,1275] 74,
 82,91,297
 Sigal I.S. [2133,2134] 199
 Sigel H. [91] 21
 Sigman D.S. [2077] 196
 Sikk P.F. [2644] 248
 Silberring J. [633] 48
 Silen J.L. [2228] 209
 Silink M. [748] 51
 Silipo C. [2645] 248
 Silver M.S. [2023,2176,2588,2903,
 2904,3343] 187,201,244,265,314,338,
 340
 Sim R.B. [560] 46
 Simmons W.H. [268] 39
 Simon M.H. [534] 45
 Simpson R.T. [2581] 243
 Singh H. [763] 51,163
 Sinha S. [509] 45
 Skidgel R.A. [1067,1799] 59,163
 Skorey K.I. [1452,1600] 105,133
 Skulski L. [104] 22

- Slebook-Tilk H. [1488] 113
 Slighon J.L. [2455] 230,231
 Sloma A. [387] 42
 Sluyterman L.A.E. [1427,2231,2934] 102,209,268,313
 Smallcombe S.H. [2968,3117] 276,292
 Smillie L.B. [274] 39
 Smith E.L. [341] 41
 Smith G.D. [913] 55
 Smith M. [2108] 198
 Smith R.A. [297,2670,2682,2683] 40, 249,250
 Smolarsky M. [1986,3341] 181,337
 Smoluchowski M.V. [2958] 274
 Snyder A.P. [2374] 221
 Södek J. [884] 54
 Söderling E. [2402] 223
 Soeda S. [437,438] 44
 Soffer R.L. [1048] 58
 Sogawa K. [832] 53
 Somayaji V. [1450,1451,1598] 105, 132
 Somkuti G.A. [2492] 234
 Sottrup-Jensen L. [563,2759,2828, 2839] 46,256,259,260
 Sorensen S.B. [239,240] 38
 Sorimachi H. [771] 51
 Soubrier F. [1350] 93
 Spencer J.N. [78] 20
 Spencer P.W. [1692] 148
 Spencer T. [3401] 359
 Spickett R.G.W. [1747] 159
 Spilburg C.A. [1366,1367] 96
 Sprang S. [2119] 198,199
 Spratt T.E. [2192,2195] 204
 Spungin A. [996] 57
 Srivastava P.N. [864] 54
 Stack M.S. [1712] 148
 Stackhouse J. [3424] 370
 Stahl M.L. [345] 41
 Stammers D.K. [1885] 167
 Starkey P.M. [413] 43
 Stauffer C.E. [1445,3224] 104,314
 Stein M.J. [2667] 249
 Stein R.L. [1844,1873,2317,2608, 2722,3177,3288,3331] 165,167,169, 219,220,246,254,308,325,335
 Steiner D.F. [1815] 164,171
 Steiner S.A. [2896,2897] 265
 Steitz T.A. [1329] 87,283,286,289, 290,291
 Stenn K.S. [2214] 208
 Stepanov V.M. [351,395,2687] 41,43, 251
 Sterchi E.E. [1165] 61
 Sternberg M.J.E. [2116] 198,199
 Steve L.J. [236] 38,39
 Stevenson B.J. [299,501] 40,45
 Stevenson K.J. [2661] 248
 Stewart J.A. [2315] 219
 Stöcker W. [1171] 61
 Stoddard B.L. [3038] 283
 Stoddard J.F. [1646] 139
 Stoeva S. [1107] 60
 Stone A.J. [1474] 109
 Stone S.R. [1811] 164,165
 Storer A.C. [3093] 286,288
 Storm D.R. [3363,3364] 353,354
 Straus O.H. [2541] 239
 Stroud R.M. [1231,3145] 73,290,304, 307
 Sturtevant J.M. [1420,2466] 101,231
 Subramanian E. [1278,1281] 74,295
 Suda H. [1773,2717] 162,254,256
 Sugimoto T. [2190,2191] 204
 Sugimura E. [361] 41
 Sugimura K. [1817] 164
 Sugiyama K. [207] 65
 Suguna K. [1282,3076] 74,284,295,296
 Suh J. [3247,3248] 317
 Suhar A. [713] 50
 Sumi H. [3308] 328
 Sumner J.B. [2480] 234
 Susi H. [2353] 220,354
 Sutherland J.H.R. [2741] 256
 Suttie J.W. [2212] 208
 Suzuki K. [186,1335,2381,2383,2384, 2769] 63,89,159,222,257
 Suzuki Y. [211] 65
 Svendsen I. [251,364] 38,41
 Svenneby G. [2409] 223
 Svensson B. [964] 56
 Swalen J.D. [26] 13
 Swamy K.H.S. [608] 47
 Swanson A.A. [218] 38
 Swedberg S.A. [3205] 313
 Sweet R.M. [108,3046] 23,283,286,290
 Swift G.H. [489,498] 45
 Szewozuk A. [703] 50
 Szigoleit A. [494] 45
 Szpacenko A. [2378,2379] 221
 Tabushi I. [2951] 273
 Taggart R.T. [846] 53
 Taguchi H. [383] 42
 Tahin Q.S. [2339] 220
 Tai J.Y. [747] 51,89
 Takagi M. [1104] 60
 Takahashi F. [76] 20
 Takahashi H. [484,510] 44,45
 Takahashi K. [889,890,3010] 54,280
 Takahashi L.H. [2877,2887] 262,263, 283
 Takahashi M. [2169,3220] 201,314
 Takahashi N. [206] 65
 Takahashi S. [483,928] 44,55
 Takahashi T. [717,718,861,1798] 50, 54,163
 Takamiya S. [1702] 148
 Takeda M. [937] 55
 Takeda Y. [1045] 58
 Takeuchi K. [1042] 58
 Takeya H. [1093] 60
 Takii Y. [2262] 210
 Takio K. [720,721] 50,67,89
 Tam L.-T. [2071] 196
 Tamres M. [2949] 272
 Tamura T. [699] 50
 Tamura Y. [2592] 245
 Tan F. [1065,1081] 59
 Tanaka J. [51] 15
 Tanaka K. [532,611,612,616,762] 45, 47,51
 Tanaka N. [880] 54,185
 Tanaka S. [949] 56
 Tanaka T. [1792] 163
 Tanford C. [118,169] 26,33,233
 Tang J. [830,1212,1302,1953,2569, 2691] 53,69,80,174,242,251,292
 Tani T. [501] 45

- Taniguohi Y. [1173] 61
 Tanizawa K. [2867,3333] 261,336
 Tankersley D.L. [2221] 209
 Tarada S. [1781] 162
 Tarasova N.I. [936] 55
 Tarentino A.L. [208] 65
 Tarnus C. [2873] 261
 Taylor A. [1306] 84
 Taylor J.M. [640] 48
 Taylor R. [85,87] 20,21
 Tellam R. [3018] 281
 Temussi P.A. [94] 21
 Teplyakov A.V. [1251] 74
 Terada I. [2223] 209
 Thibault G. [551] 46
 Thielens N.M. [562] 46
 Thomas D.J. [2485] 235
 Thomas K.A. [639,3133] 48,298
 Thompson R.C. [1763,1764,3006] 161, 280
 Thomson A. [1842] 165
 Tian G. [3436] 372
 Timasheff S.N. [2354,2356] 220
 Tisljar U. [803,804] 52
 Titani K. [310,320,1062,1103,1172] 40,59,60,61
 Tobe H. [982] 57
 Tobita T. [288] 39
 Tokunaga F. [433] 43
 Toma F. [129] 28
 Tomita N. [2201] 207
 Tomkinson B. [1316] 85
 Tommila E. [1462] 106
 Tong N.T. [399] 43
 Tonge P.J. [3325,3335] 334,336
 Tounouchi N. [901] 55
 Toole J.J. [426] 43
 Topfler H. [2488] 234
 Tosa T. [661] 48
 Towatari T. [715,761,1796] 50,51, 163
 Traficante L.J. [1006] 57
 Tramontano A. [1393,1398] 97
 Travis J. [270,291,298,2751,2757] 39,40,256,257,259,260
 Treadway W.J. [3112] 291
 Tripodi M. [519] 45
 Trocheris I. [1135] 61
 Tronrud D.E. [2893] 263,284
 Trop M. [368] 42
 Trost B.M. [2689] 251
 Truett M.A. [427] 43
 Tsai I.-H. [283,3269] 39,322
 Tschesche H. [2777,2830] 257,259
 Tseng L. [1507] 115
 Tsou Chen-Lu [2550] 240
 Tsujinaka T. [2870] 261,263
 Tsukada H. [1226] 73,77,308
 Tsunasawa S. [265,589] 39,46
 Tsurugi K. [637] 48
 Tsuru D. [707,1346] 50,89,91
 Tsushida T. [204] 64
 Tuft R.M. [2382] 222
 Tulinsky A. [1246,2874,3039] 73,262, 283,292
 Turk V. [2255,2795] 210,258
 Turková J. [366] 41,42
 Uehara Y. [2975] 275,276,278
 Ueno N. [2822] 258
 Ulmer D.D. [3025] 282
 Umezawa H. [80,3188,3189,3191] 20, 309
 Umezawa H. [2709,2710] 254
 Urdea M.S. [2089] 197
 Uroh U.A. [597] 46
 Vajda T. [2907] 266
 Valenty V.B. [2697] 252
 Valenzuela P. [2066,2414,2577] 196, 220,223,243
 Vallee B.L. [1349,2633,3390] 92,247, 357
 Valler M.J. [2820] 258
 Vanderslice P. [531] 45
 Vandlen R.L. [3119] 292
 Varani J. [1700] 148
 Varughese K.I. [3069] 284,293,294
 Vasantha N. [1106] 60
 Venoill C.F. [1788] 162
 Vendrell J. [2273] 211
 Venkatasubban K.S. [1496] 114
 Verlinden J. [974] 56
 Vermeer C. [1218] 73
 Verret C.R. [202] 64
 Vincent J.-P. [2974] 276
 Vinogradov S.N. [74] 19
 Virca G.D. [2829] 259
 Virden R. [2530] 235
 Vishnu [3330] 335
 Visser S. [1830,1931,1936] 164,167, 171,172
 Vita C. [2075] 196
 Vodkin L.O. [1186] 62
 Voellmy R. [190] 64
 Vogt V.M. [1017] 57
 Volini M. [3332] 335
 Volkenstein M.V. [3433] 371
 Voordouw G. [2368,2392] 221,222
 Vorob'ev M.M. [1915] 170
 Vos P. [393] 43
 Vosbeck K.D. [997] 57
 Wada K. [724,759] 50,51
 Wagner F.W. [1000] 57
 Wagner G.W. [970] 56
 Wagner J.C. [581] 46
 Wählby S. [377] 42
 Waite T.R. [2959] 274
 Walde P. [2538] 236
 Wallace D.A. [2617] 247
 Wallace R.A. [2552] 241
 Walsh K.A. [294,2198] 40,206
 Walter R. [1893] 167,188
 Wang C.-L.A. [2464,3286] 230,325
 Wang D. [1230] 73
 Wang J.H. [3278-3280] 324,325
 Wang T.T. [2178,2900] 201,265,338, 340
 Warme P.K. [157] 31
 Warshel A. [2125,2939,3163,3256, 3257,3380,3382] 199,270,271,273, 302,305,318,355,356,368
 Wart H.E.v. [2528,3035,3263] 235, 236,282,300,319
 Watabe S. [618,865,2407,2910] 47,54, 223,266
 Watanabe H. [2679] 250
 Watson D.C. [735] 50,89
 Watt K.W.K. [493] 45
 Watt V.M. [969] 56
 Waxman D.J. [258] 39,86

- Waxman L. [814,1835,2377] 52,165,221
 Wayne S.I. [2143] 200
 Weaver L.H. [3085] 284,301
 Weber E. [2778] 257
 Weber J.A. [3101] 288,334
 Weiner S.J. [138,1457,3255] 28,106,
 123,318
 Weingarten H. [1848] 165,194
 Weller H.N. [2624] 247
 Wells J.A. [346,2112,2118,2120,
 3307] 41,198,199,327
 Wells J.R.E. [244] 38
 West C.M. [164] 32
 West J.B. [2151] 200
 Westerik J.O'C. [2868] 261
 Westheimer F.H. [1555,3355] 126,353
 Westler W.M. [3181] 308
 Wheelock M.J. [766] 51
 Whitaker D.R. [337,2487] 41,234
 Whitaker J.R. [1543,2003] 123,183,
 337
 White E.H. [2705] 253
 Whitham S.E. [1143] 61
 Wiberg K.B. [19] 12,14,18,24
 Wilhelm S.M. [1146] 61
 Wilk S. [805] 52
 Wilkes S.H. [1097,1352,2736] 60,94,
 256
 Wilkinson K.D. [193] 64
 Willenbrook F. [2362,3167] 220,306
 Williams A.C. [2418,3199] 224,313
 Williams D.C. [3234] 316
 Williams I.H. [1475,1495,1498] 109,
 114
 Williams J.G. [798] 52
 Williams R.J.P. [3389] 357
 Williams S.P. [1217] 73
 Wilson I.A. [156] 31
 Wilson W.H. [638] 48
 Wingfield P. [999] 57
 Winkler F.K. [17] 12,14
 Winkler M.E. [465] 44
 Wintersberger E. [1214] 71
 Wipff G. [3015] 280,292
 Witheiler J. [435] 43,267
 Wittwer C.T. [205] 64
 Wlodawer A. [1286] 74
 Wolf D.H. [1075] 59
 Wolfe P.B. [646] 48
 Wolfenden R. [120,2844,2846] 26,32,
 33,260,349
 Wolthers B.G. [3124] 294
 Wong C.F. [3014] 280
 Wong Chi-H. [1279] 74
 Wong C.-H. [2114] 198
 Wong J.T.-F. [1656] 141
 Woo K.M. [1836] 165
 Woodbury R.G. [521,522,526] 45
 Woods M.J. [1771] 161,165
 Woolley D.O. [1128] 60
 Worlester D.L. [98] 22
 Wright C.S. [3059] 283,286
 Wright H.T. [1917,2282,2283] 171,
 198,212
 Wriston J.C. [658] 48,189
 Wu H.-L. [2073,2074] 196
 Wu Z.-P. [2085] 197
 Wunderer G. [2756] 256
 Wunderlich M.D. [48] 16
 Wyness K.G. [1552] 125,135
 Yagisawa S. [2172] 201
 Yamakawa N. [439] 44
 Yamamoto K. [857,872,873,934,935]
 54,55
 Yamamoto T. [2014] 185
 Yamana T. [1426] 101,102,120
 Yamauchi K. [2892] 263
 Yamauchi T. [2128] 199
 Yan T.-R. [1121] 60
 Yang H.Y.T. [255] 39
 Yang M.Y. [1101] 60
 Yaron A. [990,1053] 57,58,167
 Yasumaſu S. [1168] 61,210
 Yasunobu K.T. [1100] 60
 Yasutake A. [1776,1777] 162
 Yman L. [975] 56
 Yocum R.R. [261,1320] 39,86
 Yoder C.H. [53] 16,20
 Yokosawa H. [924] 55
 Yon J.M. [2992] 277
 Yonei M. [662] 48
 Yonezawa S. [874,2259] 54,210
 Yoshida N. [406,1828] 43,164,167
 Yoshimoto M. [2018] 186
 Yoshimoto T. [217,224,225,444,445,
 446-448,677,678,689,991,2653] 38,
 44,49,57,167,248
 Yoshimura N. [767] 51
 Yoshinaka R. [476] 44
 Yoshinaka Y. [945,946] 56
 Yoshitake S. [420] 43
 Young F.E. [1071] 59
 Young M. [2229] 209
 Yu F. [649] 48
 Yu R.J. [1148] 61
 Yung B.Y.K. [3017] 281
 Zaks A. [2432-2434] 225
 Zannis V.I. [3150] 304
 Zeeberg B. [3291,3292] 326
 Zeffren E. [2335] 220,232
 Zerner B. [1666,1761] 143,161,177,
 192,245,312
 Zhou J.-M. [2987] 278
 Zhu H.-Y. [1944] 173
 Zimmerman M. [1693,1695,2698] 148,
 252
 Zimmerman S.O. [1601] 133
 Zimmerman S.S. [36] 14,16
 Zisfein J.B. [629] 47
 Zolfaghari R. [811] 52
 Zoller M.J. [2104] 198
 Zolton R.P. [2417] 224
 Zuber H. [245,246] 38
 Zucker S. [1822] 164
 Zumbunn A. [2677] 250
 Zwilling R. [1086,2279] 59,211
 Zwilling V.R. [398] 43
 Zwizinski C. [645] 48

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ КО 2-МУ ИЗДАНИЮ	
ПРЕДИСЛОВИЕ К 1-МУ ИЗДАНИЮ	
ВВЕДЕНИЕ	
ГЛАВА ПЕРВАЯ	
СУБСТРАТЫ	
1.1. Общая характеристика	
1.2. Амидная группа	
1.2.1. Геометрия (11). 1.2.2. Электронная структура (16). 1.2.3. Свойства амидной группы (18)	
1.3. Необычные (непептидные) амидные связи и другие связи производных карбоновых кислот	
1.3.1. β -Лактамы (22). 1.3.2. Сложновфирная связь (23)	
1.4. Производные аминокислот и пептидов	
1.4.1. Состояние ионизации и гидрофобность (25). 1.4.2. Конформация (25)	
1.5. Белки как субстраты протеаз	
1.6. Вода	
1.7. Заключение	
ГЛАВА ВТОРАЯ	
ФЕРМЕНТЫ	
2.1. Классификация	
2.2. Распространение	
2.3. Характеристика отдельных типов амидгидролаз	
2.4. Первичная структура	
2.4.1. Сериновые амидгидролазы (66). 2.4.2. Цистеиновые амидгидролазы (67). 2.4.3. Аспаргатные амидгидролазы (69). 2.4.4. Металлсодержащие амидгидролазы (71). 2.4.5. Небелковые составляющие (71)	
2.5. Пространственная структура	
2.5.1. Сериновые амидгидролазы (75). 2.5.2. Цистеиновые амидгидролазы (78). 2.5.3. Аспаргатные амидгидролазы (80). 2.5.4. Металлсодержащие амидгидролазы (82)	
2.6. Активные центры	
2.6.1. Сериновые амидгидролазы (85). 2.6.2. Цистеиновые амидгидролазы (89). 2.6.3. Аспаргатные амидгидролазы (90). 2.6.4. Металлсодержащие амидгидролазы (92). 2.6.5. Сходство и различия в структуре активных центров ферментов, относящихся к разным группам (94). 2.6.6. Структура активных центров протеаз в кристаллах и растворе (95)	
2.7. Конформационная подвижность ферментов	
2.8. Протеолитическая активность иных, чем амидгидролазы ферментов. Каталитически активные антитела	
2.9. Заключение	

ГЛАВА ТРЕТЬЯНЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ. МОДЕЛИ

3.1. Термодинамика	98
3.2. Кинетика	101
3.2.1. Влияние структуры (103). 3.2.2. Влияние среды (106)	
3.3. Механизм	107
3.3.1. Нуклеофильная атака (108). 3.3.2. Тетраэдрическое промежуточное соединение (110). 3.3.3. Перенос протона и образование продуктов (113)	
3.4. Катализ	116
3.4.1. Классификация (116). 3.4.2. Каталитическая эффективность (117). 3.4.3. Катализ гидроксильной группой (119). 3.4.4. Тиоловая группа (122). 3.4.5. Карбоксильная группа (124). 3.4.6. Катализ ионами металлов (126). 3.4.7. Катализ имидазолом (128). 3.4.8. Внутримолекулярный и полифункциональный катализ (130). 3.4.9. Мицеллярный катализ (137). 3.4.10. Макромолекулярные модели амидгидролаз (138)	
3.5. Заключение	140

ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ. ФЕНОМЕНОЛОГИЯ

4.1. Ферментативная кинетика	141
4.1.1. Стационарная кинетика (141). 4.1.2. Методы определения кинетических параметров (144). 4.1.3. Смысл и значение кинетических констант (149). 4.1.4. Непродуктивное связывание (150). 4.1.5. Определение индивидуальных кинетических констант (152). 4.1.6. Отклонения от кинетики Михаелиса-Ментен (155)	
4.2. Связь скоростей и равновесий	157
4.3. Специфичность	158
4.3.1. Общая характеристика (159). 4.3.2. Количественные зависимости структуры субстратов и их реакционной способности (174). 4.3.3. Стереоспецифичность (185). 4.3.4. Соотношения между каталитическими константами и константами Михаелиса (189)	
4.4. Эффективность	190
4.5. Сравнение эффективности и специфичности амидгидролаз	193
4.6. Влияние модификации амидгидролаз на их активность	195
4.6.1. Протеолитическая модификация (195). 4.6.2. Химическая модификация (196). 4.6.3. Направленный мутагенез (198)	
4.7. Синтетическая активность амидгидролаз	200
4.8. Побочные и необычные реакции, катализируемые амидгидролазами	201
4.8.1. Транспептидация (201). 4.8.2. Обмен кислорода в карбоксильной группе ациламинокислоты (203). 4.8.3. Внолизация кетонов, α, β -элиминирование и др (204)	
4.9. Заключение	204

ГЛАВА ПЯТАЯРЕГУЛЯЦИЯ И ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ

5.1. Зимогены и их активация	206
5.2. Влияние pH среды	212
5.2.1. Кинетические закономерности (213). 5.2.2. Интерпретация значений констант ионизации (215). 5.2.3. Экспериментальные данные (218)	

5.3. Влияние ионов и ионной силы раствора	220
5.3.1. Специфические ионы (221). 5.3.2. Влияние ионной силы раствора (223)	
5.4. Влияние органических растворителей	224
5.5. Кинетический изотопный эффект растворителя	225
5.6. Влияние температуры и давления	227
5.6.1. Теория (227). 5.6.2. Экспериментальные данные (229). 5.6.3. Компенсационный эффект (232). 5.6.4. Температурная устойчивость амидгидролаз. Термостабильные ферменты (233)	
5.7. Криоэнзимология амидгидролаз	235
5.8. Мицеллярная энзимология	236
5.9. Ингибиторы	237
5.9.1. Кинетика ингибирования (237). 5.9.2. Неспецифические ингибиторы (240). 5.9.3. Специфические обратимые ингибиторы (243). 5.9.4. Необратимые группоспецифические ингибиторы (247). 5.9.5. "Синкаталитические" ингибиторы (252). 5.9.6. Природные ингибиторы (254). 5.9.7. Ингибиторы - "аналоги переходных состояний" (260)	
5.10. Активация	265
5.11. Аллостерические эффекторы	266
5.12. Автолиз	267
5.13. Заключение	268

ГЛАВА ШЕСТАЯ

ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

6.1. Силы взаимодействия	270
6.1.1. Дисперсионные взаимодействия (270). 6.1.2. Гидрофобные взаимодействия (271). 6.1.3. Водородная связь (272). 6.1.4. Электростатические взаимодействия (273). 6.1.5. Другие типы взаимодействий (273)	
6.2. Кинетика комплексообразования	274
6.2.1. Теория (274). 6.2.2. Экспериментальные данные (275). 6.2.3. Стабильность комплексообразования (275)	
6.3. Термодинамика	278
6.4. Конформационные изменения	281
6.5. Структура комплексов	283
6.5.1. Конформация субстрата в активном центре (285). 6.5.2. Состояние расщепляемой связи (287). 6.5.3. Расположение на ферменте и взаимодействия (288)	
6.6. Оценка полной энергии фермент-субстратного взаимодействия	302
6.7. Заключение	302

ГЛАВА СЕДЬМАЯ

ХИМИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СУБСТРАТА

7.1. Состояние каталитически активных групп	304
7.2. Системы переноса заряда	307
7.3. Состояние расщепляемой группы субстрата	311
7.4. Ковалентный или общий основной катализ?	311
7.5. Электрофил	318
7.6. Нуклеофильная атака. Элементарный акт	319
7.7. Промежуточное тетраэдрическое соединение	324

7.8. Перенос протона и распад тетраэдрического промежуточного соединения	327
7.9. Ацилферменты и комплексы фермент-продукт	332
7.10. Механизмы ферментативного гидролиза в сравнительном аспекте	340
7.11. К вопросу об эволюции химических механизмов амидгидролаз	347
7.12. Заключение	347

ГЛАВА ВОСЬМАЯ

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ. ТЕОРИИ И ГИПОТЕЗЫ

8.1. Общие сведения	349
8.2. Факторы катализа	351
8.2.1. Сближение и ориентация (351). 8.2.2. Орбитальный контроль (353).	
8.2.3. Сольватационные эффекты (354). 8.2.4. Электростатические эффекты (355).	
8.2.5. Деформация субстрата (356). 8.2.6. Полифункциональный катализ (357).	
8.2.7. Квантово-химические эффекты (357)	
8.3. Теории и гипотезы. Дестабилизация основного состояния	358
8.3.1. Непродуктивное связывание (358). 8.3.2. Теория напряжений (362).	
8.3.3. Индуцированное соответствие (364)	
8.4. Стабилизация переходного состояния	366
8.5. Фермент - "машина"	369
8.6. Квантово-химическое описание ферментативных реакций	371
8.7. "Идеальный" фермент	371
8.8. Основное состояние элементарного акта ферментативной и модельной реакций	372
8.9. Фермент не понижает энергию активации элементарного акта химической реакции	373
8.9.1. Описание модели (374). 8.9.2. Кинетическое рассмотрение модели (375).	
8.9.3. Термодинамическое рассмотрение модели (378)	
8.10. Пути к общей теории протеолиза	379
8.11. Заключение	382

ЛИТЕРАТУРА	383
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	462
УКАЗАТЕЛЬ ИМЕН	482

Научное издание

Антонов Владимир Константинович
ХИМИЯ ПРОТЕОЛИЗА

2-е издание, исправленное и дополненное

Утверждено к печати Институтом биоорганической химии
им. М.М. Шемякина Академии наук СССР

Заведующая редакцией Н.Ф. Промашкова

Редактор издательства О.Л. Оболенская
Художественный редактор И.Ю. Нестерова, Технический редактор Л.И. Куприянова
ИБ № 48296

Подписано к печати 20.11.91. Формат 70 × 100 1/16. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная
Усл.печ.л. 41 Усл.кр.отт. 41. Уч.-изд.л. 47,1. Тираж 490 экз. Тип. Зак. 3068. Цена 15 р.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство "Наука" 117864 ГСП-7, Москва В-485
Профсоюзная ул., 90

Ордена Трудового Красного Знамени
1-я типография издательства "Наука", 199034, Санкт-Петербург, В-34, 9-я линия, 12

Оригинал-макет подготовлен на персональном компьютере в Институте
биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН СССР С.Л. Александровым